

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平11-506315

(43) 公表日 平成11年(1999) 6月8日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	FI	
C12N 15/09		C12N 15/00	A
A61K 35/76	ABB	A61K 35/76	ABB
	AED		AED
48/00	ADU	48/00	ADU

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 33 頁)

(21) 出願番号	特願平8-533509	(71) 出願人	カンジ インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア 92121 サンディエゴ サイエンス パーク ロ ード 3030 スイート 302
(86) (22) 出願日	平成8年(1996) 5月2日	(72) 発明者	グレゴリー, リチャード, ジェイ. アメリカ合衆国 カリフォルニア 92008 カールスパッド ゲートシード ロード 4789
(85) 翻訳文提出日	平成9年(1997) 10月31日	(72) 発明者	ファン, ウエイメイ アメリカ合衆国 カリフォルニア 92120 サンディエゴ ヒールズ ストリート 12295
(86) 国際出願番号	PCT/US96/06199	(74) 代理人	弁理士 専 経夫 (外1名)
(87) 国際公開番号	WO96/34969		
(87) 国際公開日	平成8年(1996) 11月7日		
(31) 優先権主張番号	08/433, 798		
(32) 優先日	1995年5月3日		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 複製受容性標的化アデノウイルスベクターを用いる遺伝子治療

## (57) 【要約】

本発明は、治療遺伝子および少なくとも1つの複製遺伝子に操作により連結された疾病特異的遺伝子調節領域を含む複製受容性アデノウイルスベクターを投与することによるがんの治療方法を提供する。複製受容性標的化アデノウイルスベクターは腫瘍細胞において優先的に複製し、続いて腫瘍特異的遺伝子調節領域を活性化し、それにより複製受容性アデノウイルスベクターにより運搬された治療遺伝子の効果を増幅する。本発明は、選択的に複製し治療投与量の治療遺伝子を伝達する少量のウイルスベクターを用いてがんを処置するために治療遺伝子の標的化を初めて可能にする。

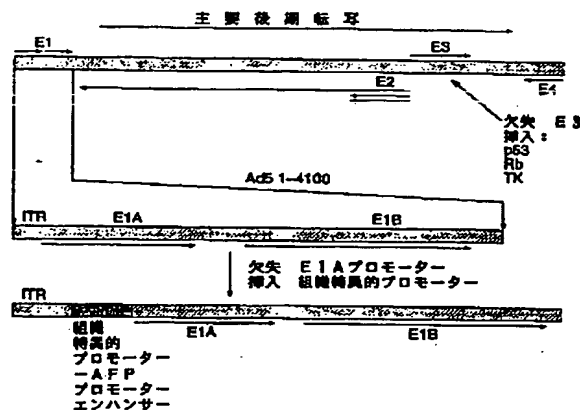


FIG. 1

## 【特許請求の範囲】

1. 治療遺伝子および少なくとも1つの複製遺伝子に操作により連結された疾病特異的遺伝子調節領域を含む複製受容性アデノウイルスベクターを投与することからなる哺乳類のガン細胞を処置する方法であって、該ガン細胞は腫瘍特異的遺伝子調節領域を活性化しアデノウイルスベクターの複製を引き起こす、上記方法。
  2. 疾病特異的遺伝子調節領域がアルファーフエトプロテインプロモーター／エンハンサーである請求項1記載の方法。
  3. ガン細胞が肝細胞性ガン腫である請求項2記載の方法。
  4. 疾病特異的遺伝子調節領域がガン胚抗原プロモーター／エンハンサーである請求項1記載の方法。
  5. 哺乳類のガン細胞が乳ガン細胞である請求項4記載の方法。
  6. 哺乳類のガン細胞が結腸直腸ガン細胞である請求項4記載の方法。
  7. 疾病特異的遺伝子調節領域が前立腺特異的抗原プロモーター／エンハンサーである請求項1記載の方法。
  8. 哺乳類のガン細胞が前立腺ガン細胞である請求項7記載の方法。
  9. 疾病特異的遺伝子調節領域がチロシナーゼプロモーター／エンハンサーである請求項1記載の方法。
  10. 哺乳類のガン細胞が黒色腫ガン細胞である請求項
- 9記載の方法。
11. 外来遺伝子が致死遺伝子である請求項1記載の方法。
  12. 致死遺伝子がヘルペスシンプレックスチミジンキナーゼ遺伝子である請求項11記載の方法。
  13. 治療遺伝子が腫瘍サプレッサー遺伝子である請求項1記載の方法。
  14. 上記腫瘍サプレッサー遺伝子がp53、RB、RB突然変異体、p21、p53突然変異体からなる群から選択される請求項13記載の方法。
  15. 複製遺伝子がE1a遺伝子である請求項1記載の方法。
  16. 複製遺伝子がウイルスE1遺伝子の1種である請求項15記載の方法。

17. 複製遺伝子がウイルスE2遺伝子である請求項1記載の方法。

18. 複製遺伝子がウイルスE4遺伝子である請求項1記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 複製受容性標的化アデノウイルスベクターを用いる遺伝子治療

本発明は、一般的には、実質的なウイルス遺伝子の上流に治療遺伝子および腫瘍特異的エンハンサー／プロモーターを含む複製受容性標的化ウイルスの投与による、疾病、そして中でも特にガンの処置のための遺伝子治療方法に関するものであり、ガン細胞は腫瘍特異的プロモーターを活性化して、ウイルスによる治療遺伝子の細胞毒性作用の複製、それによる増幅を引き起こす。

ガンのような異常な病理学的状態の処置における遺伝子治療の目標は細胞増殖の正常な調節を再構築すること、または異常な増殖を行う細胞を排除することである。生体内遺伝子変性が治療上の効果を導き得る3種の初期の戦略がある。これらの戦略は異常細胞に対する免疫原性の発生、異常表現型を導く遺伝子欠陥の矯正およびその生成物が受容細胞に対して毒性であるか、または毒性となり得る遺伝子の伝達を包含する。これら3種全ての戦略の中で、最小の副作用でもって最大の効果をもたらすと考えられるものは、できるだけ多くの細胞に治療遺伝子を選び、一方では異常に増殖する細胞への治療遺伝子の機能的伝達を調節するベクターを伝達することである。

遺伝子欠陥の矯正の特定の例は、例えば p 5 3 仲介遺伝子治療を用いて通常の細胞増殖の制御を回復するものである。p 5 3 は細胞周期の移行において中心的な役割

をしており、修復またはアポプトシスがDNA損傷に応答して生じ得るように成長を阻止する。野生型 p 5 3 は照射またはいくつかの化学療法剤での処置により誘導されるアポプトシスのために必要な成分として最近同定されている (Lowe等, (1993) AおよびB)。ヒト腫瘍における p 5 3 突然変異の高率での存在の故に、化学療法および照射処置に対し抗療性になる腫瘍が野生型 p 5 3 の欠如に一部起因してそのようになり得る可能性がある。機能的 p 5 3 供給することにより、これらの腫瘍は放射線および化学療法により誘導されるDNA損傷と通常関連するアポプトシスを受けやすい。

p 5 3 欠損腫瘍を処置する場合のように、遺伝子治療は、腫瘍細胞の細胞周期

移行を制御するために、および／または細胞死を誘導するために、単独で、または化学療法剤と組み合わせて使用され得る他の腫瘍サプレッサー遺伝子に同様に適用可能である。さらに、細胞周期調節タンパク質をコードしないが、細胞死を直接誘導する遺伝子、例えば致死遺伝子、または細胞に直接毒性である遺伝子は、遺伝子治療プロトコルに使用され得、腫瘍細胞の細胞周期移行を直接排除する。

遺伝子が細胞周期移行の制御を回復するために使用されているにもかかわらず、この試みの合理的かつ実用的な適用性は同一である。すなわち、高い効率の遺伝子移送を達成することは、組換え生成物の治療量を発現することである。患者に対して最小の危険性で高い効率の遺

伝子移送を可能にするために使用するベクターの選択は、それ故に、遺伝子治療処置の成功のレベルにとって重要である。

ガンまたはある種の他の疾病の遺伝子治療を成功させる重要なポイントの一つは、異常細胞の顕著な部分に影響を及ぼす能力である。レトロウイルスベクターの使用は様々な腫瘍モデルにおいてこの目的のために広く探究されている。例えば、肝臓の悪性腫瘍の処置において、レトロウイルスベクターが使用されたが、ほとんど成功しなかった。これは、これらのベクターが生体内遺伝子治療に必要な遺伝子移送の高いレベルを達成することができなかったことによる (Huber, B. E. 等, 1991; Caruso M. 等, 1993)。

ウイルス産生のより継続される供給源を達成するために、研究者は固体腫瘍中にレトロウイルス収納細胞株の直接注入により、遺伝子移送の低レベルと関連する問題を克服することが試みられた (Caruso, M. 等, 1993; Ezzidine, Z. D. 等, 1991; Culver, K. W. 等, 1992)。しかしながら、これらの方法は、その方法が煩雑であり、そして患者において収納細胞株に対する炎症性応答を誘導するので、ヒトの患者への使用には満足できるものではない。レトロウイルスベクターのもう一つの欠点は、それらが当該組換え遺伝子を効率よく組み込み、そして発現するために、分割細胞を必要とすることである (Huber, B. E. 1991)。実質的な宿主遺伝子中への安定な

組み込みは病理学的疾病状態の進展または遺伝を導き得る。

組換えアデノウイルスはレトロウイルスおよび他の遺伝子伝達法に比べ明らかな利点を有する（参考のために、Siegfried(1993)参照）。アデノウイルスがヒトにおいて腫瘍を誘導することは決して示されておらず、そして生ワクチンとして安全に使用されてきた（Straus (1984)）。複製欠損組換え組換えアデノウイルスは複製に必要なE1領域を標的遺伝子で置換することにより製造され得る。アデノウイルスは感染の通常の結果としてヒトゲノム中に組み込まれない。これにより、レトロウイルスまたはアデノ関連ウイルス（AAV）ベクターの場合に可能性のある挿入突然変異誘導の危険性を大きく低下させている。安定な組み込みのこの欠如はまた、染色体外DNAが通常細胞の連続する分割と共に徐々に失われるので、移送された遺伝子の作用が一時的であるというさらに安全な態様を導く。安定な高い力価の組換えアデノウイルスはレトロウイルスまたはAAVでは依然として達成できないレベルで産生され得、大量の患者数を処置するために十分な材料の産生を可能にする。さらに、アデノウイルスベクターは広範囲の組織および腫瘍細胞タイプ中に効率よく生体内遺伝子移送することができる。例えば、その他のものは、アデノウイルス仲介遺伝子伝達が疾病、例えば嚢胞性繊維症の遺伝子治療（Rosenfeld 等, (1992); Rich等, (1993)）および $\alpha_1$ -アンチト

リブシン欠損症（Lemarchand等, (1992)）のために高い可能性を有することが示されている。遺伝子伝達のための他の方法、例えばカチオンリボソーム/DNA複合体もまた現在研究されているけれども、アデノウイルス仲介遺伝子伝達ほど有効であるものは未だ出現していない。遺伝子治療用途のために現在試験されているアデノウイルスベクターは、それらを複製不全にするようにAd2またはAd5が典型的には欠失されている。

アデノウイルスベクターは遺伝子伝達ビヒクルの他の態様に比べいくつかの利点を提示するけれども、それらは、生体内での有効な使用に制限を課すいくつかの特徴を依然として示す。これらの制限は腫瘍集合体に治療遺伝子を効率よく伝達および標的化するために、ベクターの限定された能力を主に結果的に導く。大

量の伝達薬剤を腫瘍環境に投与することにより、研究者は上記の問題を回避することを試みたが、これは分散した移転性疾患を処置する場合には実行可能とは思われない。上記の問題に対する解決は、腫瘍組織において複製し、そしてそれによりウイルスが持っていたあらゆる治療遺伝子の効果を増幅する能力を保持するウイルスベクターの使用にあるということが最近提案されている (S. J. Russell, 1994, European Journal of Cancer 8, 1165-1171)。ガンの処置における複製するウイルスの可能な使用は長い歴史を有し (Id.)、そして非常に多くのウイルスタイプがガン治療剤として実験的試行において顕著な成

功をみることなく使用されてきた。

従って、治療遺伝子を異常に増殖している細胞に特異的に標的化し、そしてまた、治療遺伝子の非常に多くのコピー数が疾病組織の効率のよい通過を可能にすることにより、より高い効率を達成することを可能にする方法に対する要求がある。本発明はこの要求を満足し、そして関連する利点をさらに提供する。

#### 発明の要約

本発明は、治療遺伝子および少なくとも1つの複製遺伝子に操作により（操作可能に）連結された疾病特異的遺伝子調節領域を含む複製受容性アデノウイルスベクターを投与することによるガンの治療方法を提供する。複製受容性標的化アデノウイルスベクターは腫瘍細胞において優先的に複製し、続いて腫瘍特異的遺伝子調節領域を活性化し、それにより複製受容性アデノウイルスベクターにより運搬された治療遺伝子の効果を増幅する。本発明は、選択的に複製し治療投与量の治療遺伝子を伝達する少量のウイルスベクターを用いてガンを処置するために治療遺伝子の標的化を初めて可能にする。

#### 図面の簡単な説明

図1はrAd/AFPE1a/TKの模式図である。ヌクレオチド355と483の間にE1aプロモーターを含むアデノウイルス5型配列は欠失され、そしてアルファヘテロプロテインエンハンサー/プロモーターを含む1.7kb断片で置換されている。また、2858

3と30470に相当するAd5の間のE3領域におけるアデノウイルス5型配列は欠失され、そしてその場所にはHSV-1チミジンキナーゼ遺伝子に対応する1130塩基対の断片が挿入されている。

図2は肝細胞がん腫(HCC)細胞株におけるrAd/AFP-E1a/TKの複製を示す。rAd/AFP-E1a/TKおよび複製受容性対照ウイルスd1327が、2種のHCC細胞株を感染するために使用された。d1327はrAd/AFP-E1a/TKにおいて欠失されたE3の同じ領域が欠失されているが、通常のE1aプロモーター領域を含む。このHep3D細胞株はアルファ-フェトプロテインを産生するが、HLE細胞株は産生しない。複製はウイルスDNAを単離し、そして示された時点でサザンブロット分析を行うことにより評価された。放射活性なプローブにより評価されるような複製はモレキュラー・ダイナミクス・ホスホリメジャーを用いて計測された。結果はこれらの細胞株において対照ウイルスd1327の複製に対して標準化される。A) Hep3B細胞におけるrAd/AFP-E1a/TKの複製。B) HLE細胞におけるrAd/AFP-E1a/TKの複製。

図3は、各々の時点でのd1327ウイルスの複製に対して標準化されたHep-3B(AFP陽性)対HLE(AFP)陰性細胞株におけるAd/AFP-E1a/TK複製の比較。rAd/AFP-E1a/TKはA

AFP陽性HCC細胞において優先的に複製する。

#### 本発明の詳細な説明

本発明は、遺伝子治療および該当する特定の部位、すなわちガン細胞内に治療遺伝子を選択的に発現するための疾病特異的複製受容性アデノウイルスベクターの使用に関するものである。複製受容性ベクターの使用は、治療遺伝子が、ウイルス複製により増幅され、そして近傍の細胞への移送が可能となる少数の腫瘍細胞に最初に伝達され得るという利点がある。従って、複製は遺伝子伝達段階の全体の効率を高め、それによって、遺伝子治療プロトコルの効果を高める。宿主の通常の免疫系は体全体にウイルスの拡散を防止する。

一つの態様において、本発明は、本発明の方法を用いて治療物質の標的化され



た伝達を可能にするユニーク因子物質がある、ガンおよび他の過剰増殖疾患または疾病を処置するために、操作された複製受容性組換えアデノウイルスの治療的使用に関する。ウイルスは通常の細胞において複製するそれらの能力が低下するように変性され、特定の腫瘍タイプにおいて効率よく複製する能力を保持する。アデノウイルスベクターは治療遺伝子、例えば致死性であるか、またはガンを非悪性にする細胞毒性遺伝子または腫瘍サプレッサー遺伝子、またはある種のウイルス、例えば肝炎ウイルスまたはサイトメガロウイルスに対するアンチセンス化合物、または抗ウイルス化合物、例えばインターフェロン-アルファを包含する。

腫瘍特異的複製受容性ベクターは、アデノウイルスE1a遺伝子のプロモーターが腫瘍特異的プロモーター/エンハンサーで置き換えられるように操作されている。これらの組換えウイルスと遺伝子治療に典型的に使用されるものとの重要な相違は、複製遺伝子、例えばE1遺伝子自身が得られる組換えアデノウイルスに保持されていることである。ウイルスE1遺伝子は多くの他の重要なウイルス遺伝子の転写を制御するので (Horowitz, 1990)、この変性はE1aプロモーターの代わりに挿入された腫瘍特異的プロモーター/エンハンサーを利用する腫瘍にウイルス複製を制限する。細胞毒性遺伝子の一例は、それ自身が薬剤ガンシクロビルの存在下で複製細胞に選択的毒性を有するヘルペスシンプレックス (単純ヘルペス) 1型チミジンキナーゼ遺伝子である (F. L. Moolten, 1986)。腫瘍塊内の組換えアデノウイルスの複製はウイルスに運搬された細胞毒性遺伝子の効果を増幅する。

本明細書において使用される際に、用語「治療遺伝子」は治療に利益となる効果、例えば細胞周期の制御または細胞死の誘導を有するタンパク質をコードする核酸配列を意味する。細胞周期を制御する遺伝子の例はp53、RBおよびミトシンを包含し、一方、細胞死を誘導する遺伝子は条件つき致死遺伝子チミジンキナーゼを包含する。エフェクター細胞の免疫学的機能を高めるサイトカインはまた、本明細書で定義されたような用語内に

包含される。治療遺伝子は、本発明の方法において使用される複製受容性アデノウイルスベクターから発現される実質的に外来遺伝子である。これらの外来遺伝子はそれ故に、野生型アデノウイルスに見られる対応DNA分子とは同じ配向および位置には存在しないDNA分子である。外来遺伝子は約4.5キロベースまでのDNA分子であってよい。

そのような遺伝子の治療上有効な作用は作用の直接または間接の様式のいずれかにより付与され得る。例えば、直接作用する治療遺伝子は細胞増殖のために必要である遺伝子を包含し得る。そのような直接作用遺伝子の例は腫瘍サプレッサー遺伝子および細胞周期調節遺伝子である。作用の間接様式により有用である治療遺伝子の例は、細胞毒性特徴を示す遺伝子および免疫モジュレーター（イムノモジュレーター、免疫制御）遺伝子である。細胞毒性遺伝子は単独で、または他の薬剤と組み合わせて使用される場合に、治療上有効であり得る。

本発明の治療遺伝子の定義内に包含されるのは、それらの活性な断片および遺伝子産物の意図された機能に顕著に影響を与えないわずかな変性（修飾）を含む遺伝子である。従って、治療遺伝子の「活性断片」は治療上の効果を有するタンパク質をコードする能力を保持する遺伝子のより小さい部分を包含する。下により十分に記載されているp56<sup>ras</sup>は腫瘍サプレッサー遺伝子である治療遺伝子の活性断片の一例にすぎない。考慮される治療

遺伝子の変性は、未変性遺伝子の機能的活性が保持される限り、ヌクレオチド追加（付加）、欠失または置換を包含する。従って、そのような変性は天然のタンパク質またはポリペプチドの線状配列から外れるが、その生物学的活性を変更しないアミノ酸置換を有する同等の遺伝子産物を生じる。これらの同等物は1またはそれ以上のアミノ酸の関連アミノ酸、例えば類似の荷電アミノ酸への置換、または側鎖もしくは官能基の置換もしくは変性により天然の配列とは異なり得る。

本明細書において使用される際に、用語「操作して（操作可能に）連結」は所望のポリペプチドの生物学的産生を結果として生じる発現要素（発現エレメント）へのあるコード性核酸配列の結合を意味する。それ故に、「発現要素」は本明細書において使用される際に、コード性核酸からの遺伝子産物の適当な転写、プ

ロセシング、翻訳およびソーティングを導く全ての核酸要素を意味する。そのような要素は、例えばプロモーターおよび調節要素、例として本明細書で上記したような腫瘍特異的プロモーター／エンハンサー、スプライシング配列、翻訳開始および終結配列およびシグナル配列を包含し得る。

本明細書において使用される際に、用語「複製受容性アデノウイルスベクター」または「アデノウイルスベクター」はガン細胞において優先的に複製し、そして従ってウイルスにより運搬された治療遺伝子の効果を増幅するアデノウイルスゲノムから誘導されるベクターを意味

する。ベクターの複製は疾病組織の特徴的な因子の存在に依存する。該因子はベクターの複製を誘発し、そして次に治療効果の増幅を誘発する。本発明のアデノウイルスベクターは通常の細胞において複製するそれらの能力が低下または消失するように本明細書に記載のように操作され、特定の腫瘍疾病細胞タイプにおいて効率よく複製する能力を保持する。

本明細書において使用される際に、用語「腫瘍特異的遺伝子調節領域」または「腫瘍特異的調節領域」または「腫瘍特異的プロモーター」または「腫瘍特異的プロモーター／エンハンサー」は特異的腫瘍細胞タイプにおいて選択的または優先的に機能する転写および／または翻訳調節領域を意味する。選択的または優先的機能は、治療遺伝子が標的化または特異的腫瘍細胞タイプにおいて主として発現されるので、遺伝子治療処置に特異性を付与する。腫瘍特異的調節領域は、腫瘍細胞タイプ特異的である転写、mRNA成熟シグナルおよび翻訳調節領域を包含する。転写調節領域は、例えばプロモーター、エンハンサーおよびサイレンサーを包含する。そのような転写調節領域の特定の例は、アルファフェトプロテイン、ガン胚抗原および前立腺特異的抗原のためのプロモーター／エンハンサーを包含する。RNAプロセシングシグナルは、例えば組織特異的イントロンスプライシングシグナルを包含し、一方、翻訳調節シグナルは、例えばmRNA安定シグナルおよび翻訳開始シグナルを包含

し得る。従って、腫瘍特異的調節領域は特異的腫瘍細胞タイプにおける成熟遺伝

子産物の産生に必須である全ての要素を包含する。

本明細書において使用される際に、用語「腫瘍サプレッサー遺伝子」は細胞が腫瘍細胞としてふるまうのを有効に阻害するタンパク質をコードする遺伝子を意味する。腫瘍サプレッサー遺伝子の特定の例は網膜芽腫（RB）遺伝子である。完全なRB cDNAヌクレオチド配列および得られるRBタンパク質（p110<sup>RB</sup>と表記される）の予測アミノ酸配列はLee等（1987）に示されている。p110<sup>RB</sup>の先端切除体はp56<sup>RB</sup>と呼ばれ、これもまた、腫瘍サプレッサー遺伝子として機能し、そしてそれ故に治療遺伝子として有用である。p56<sup>RB</sup>の配列はHuang等（1991）に記載されている。RB以外の腫瘍サプレッサー遺伝子は例えばp16タンパク質（Kamb等（1994））、p21タンパク質、ウィルムス腫瘍WT1タンパク質、または結腸ガン腫DDCタンパク質または関連分子、例えばミトシンおよびH-NUCを包含する。ミトシンは1993年10月22日出願のZhuおよびLee、米国出願第08/141239号および1994年10月24日出願のそれに続く同じ発明者による一部継続出願、代理人証書番号P-CJ1191（両方の文献は参照により本明細書に編入される）に記載されている。同様に、H-NUCは参照により本明細書に編入される1993年12月20日出願のW-H LeeおよびP-L Chen、

米国出願第08/170586号に記載されている。

腫瘍サプレッサータンパク質の定義内に包含されるのはまた、その存在が宿主細胞の腫瘍形成性、悪性度または過剰増殖表現型を低下または解消することにより新生物表現型を抑制するあらゆるタンパク質である。新生物表現型は変更された形態、促進された成長速度、より高い飽和密度、柔らかい寒天中での増殖および腫瘍形成性による特徴づけられる。上記の治療遺伝子はこの活性を示すタンパク質をコードする。「腫瘍形成性」は腫瘍を形成するか、または腫瘍形成を引き起こす能力を有することを意味することが意図されており、そして新生物成長と同意語である。「悪性度」は転移し、そして宿主生物の生命を危険にさらす能力を有する腫瘍形成性細胞を記載することが意図される。「過剰増殖表現型」は細胞タイプに対する成長の通常の限界を越える速度で成長し、そして分裂する細胞

を記載することが意図される。「新生物」もまた、内因性機能的腫瘍サプレッサータンパク質を欠如する細胞または細胞がある機能的腫瘍サプレッサータンパク質をコードする内因性核酸を発現する能力を欠如することを包含する。

本明細書において使用される際に、用語「細胞周期調節遺伝子」は細胞周期内の1またはそれ以上の調節段階を直接的または間接的に制御するタンパク質をコードする遺伝子を意味する。そのような細胞周期調節段階は、例えば増殖表現型への休止の制御、例としてG<sub>0</sub>G<sub>1</sub>移

行ならびにアポプトシスへの進行を包含する。細胞周期調節遺伝子の例はサイクリンおよびサイクリン依存キナーゼを包含する。

本明細書において使用される際に、用語「免疫モジュレーター遺伝子」は、増殖する腫瘍細胞に対する宿主固有の応答を増大する免疫系に直接的または間接的に影響を及ぼすタンパク質をコードする遺伝子を意味する。そのような免疫制御遺伝子は、例えば免疫系のエフェクター細胞により認識されるサイトカイン、例としてインターロイキンおよびインターフェロンを包含する。

本明細書において使用される際に、用語「細胞毒性遺伝子」は、単独または他の薬剤と組み合わせて、細胞生命を死に到らしめるタンパク質をコードする遺伝子を意味する。単独で致死性である細胞毒性遺伝子の例は毒素、例えば百日咳毒素、ジフテリア毒素等を包含する。他の薬剤と組み合わせて使用されて細胞死に到らしめる細胞毒性遺伝子の例は、例えばヘルペスシンプレックス-1チミジンキナーゼおよびシトシンデアミナーゼを包含する。対象はこの際、抗腫瘍遺伝子の存在下で細胞に対して毒性である治療剤を有効量投与される。チミジンキナーゼの特定例において、治療剤はチミジンキナーゼ基質、例えばガンシクロビル（GCV）、6-メトキシプリンアラビノヌクレオシド（araM）またはそれらの機能的同等物である。チミジンキナーゼ遺伝子およびチミジンキナーゼ代謝物の両方は宿主細胞に毒性であるように

同時に使用されなければならない。しかしながら、その存在において、GCVはホスホリル化されており、そしてDNA合成の潜在的阻害剤になり、araMは

細胞毒性アナボライト  $\alpha$  r a A T P に変換される。他の抗腫瘍遺伝子は同様に、腫瘍細胞の増殖を低減するために、相当する治療剤と組み合わせて使用され得る。そのような他の遺伝子および治療剤の組合せは当業者により知られている。別の例は酵素シトシンデアミナーゼを発現する本発明のベクターである。そのようなベクターは薬剤 5-フルオロウラシルの投与と組み合わせて使用されており、(Austin および Huber, 1993)、また最近の報告では大腸菌  $D e o \Delta$  遺伝子が 6-メチルプリン-2'-デオスリボヌクレオシドと組み合わせて使用されている (Sorscher 等, 1994)。

本発明は哺乳類ガン細胞を処置する方法を提供する。該方法は治療遺伝子および少なくとも 1 つの複製遺伝子に操作により (操作可能に) 連結された疾病特異的遺伝子調節領域を含む複製受容性標的化アデノウイルスベクターを投与することからなり、疾病細胞は疾病特異的遺伝子調節領域を活性化する。

当業界で公知であったものとは異なり、本発明は、選択された部位で選択的に複製する複製受容性組換えアデノウイルスの使用を特許請求している。感染に続いてウイルスゲノムは細胞核に局在化する。アデノウイルス複製は次いで  $E 1 a$  遺伝子の初期転写により進行する。E

$1 a$  遺伝子の生成物は次に他の初期転写ユニット、 $E 1 b$ ,  $E 2$ ,  $E 3$  および  $E 4$  の転写を活性化する。これらの生成物は、主要な後期転写ユニットが活性化されて主要なウイルス構造タンパク質およびウイルスアッセンブリーの核内での合成を誘導する点で DNA 合成を開始する。

本発明の複製受容性ベクターは、標的化腫瘍細胞タイプにおいて優先的に複製するということにおいて疾病特異的である。この腫瘍特異的複製受容能は腫瘍特異的遺伝子調節領域に複製のための少なくとも 1 つの遺伝子を操作により連結することにより達成される。複製に必要な遺伝子は上記のあらゆるもの、例えば  $E 1 a$  遺伝子である。他の遺伝子、例えば  $E 2$ ,  $E 4$  および主要な後期転写ユニットは腫瘍特異的複製受容能を達成することができるが、増殖に必要な他のアデノウイルス遺伝子の発現を制御することにおいて  $E 1 a$  の使用が有利である。従って、本発明は  $E 1$  遺伝子を保持するアデノウイルスベクターおよび  $E 1 a$  遺伝子

を保持するものを提供する。

本発明の方法において有用な複製受容性アデノウイルスベクターは特定の用途のための所望の機能を達成するように変性され得る。そのような変性は、治療遺伝子の伝達および効果を高めるようなアデノウイルスまたは外因性配列の付加、欠失または置換を包含する。さらに、Cウイルス、セロタイプ1, 2, 5および6のあらゆる群に基づいたアデノウイルスベクターならびにベクター、

例えばアデノウイルスベクターに基づいたAd2/Ad5が本発明の方法において使用され得る。

本発明は細胞毒性遺伝子、例えば条件つきで致死的なヘルペスシンプレックスチミジンキナーゼ遺伝子である治療遺伝子を提供する。本発明はまた、腫瘍サプレッサー遺伝子である治療遺伝子を提供する。腫瘍サプレッサー遺伝子の例は例えばp53、RB、RB突然変異体、p21、p53突然変異体またはミトシンを包含する。そのような治療遺伝子の発現は細胞周期移行の制御の回復を結果的に生じる。治療遺伝子は、優先的組織特異的発現が実質的な複製遺伝子の腫瘍特異的発現によるように、誘導性プロモーターの制御下にあってもよい。また、治療遺伝子は同様に、腫瘍特異的遺伝子調節領域の制御下にあってもよい。複製遺伝子と治療遺伝子の両方の組み合わせられた腫瘍特異的発現は、より高い特異性が達成され、それ故に本方法のより優れた効果が得られる点において有利である。

細胞毒性である治療遺伝子は直接致死的であり、標的化された腫瘍細胞の細胞死を逃げるものであっても、また、それらは例えば条件に応じて致死的である、例えば致死遺伝子により代謝される場合に毒性となることのできる薬剤と組み合わせて使用される致死遺伝子であってもよい。そのような致死遺伝子の特定の例はヘルペスシンプレックスチミジンキナーゼ(TK)遺伝子である。

特定の用途に必要な種々の遺伝子でベクターを変更し

て、より高い柔軟性を与えるために、発現カセットが本発明の複製受容性ベクター中に含有され得る。発現カセットはそれ故に、当該の治療遺伝子の組換え産生を達成するベクターの能力を記載する機能的用語である。

本発明は、遺伝子調節領域がアルファ<sub>1</sub>-フェトプロテインプロモーター／エンハンサー、ガン胚抗原プロモーター／エンハンサー、チロシナーゼプロモーター／エンハンサーおよび前立腺特異的抗原プロモーター／エンハンサーからなる群から選択される腫瘍特異的複製受容性ベクターを提供する。他の疾病、例えば炎症状態のために、インデューサーはTNF- $\alpha$ および応答調節要素のインターロイキン-6 (IL-6) プロモーターであってよい。治療遺伝子はインターロイキン-10 (IL-10) または別の抗炎症性サイトカインをコードし得る。

本発明の方法において有用なベクターは特異的腫瘍細胞において特異的に複製する。腫瘍特異性は複製に必須である1またはそれ以上の遺伝子の発現を誘導する腫瘍特異的遺伝子調節領域の含有に起因する。そのような要素は例えばアルファ<sub>1</sub>-フェトプロテインプロモーター／エンハンサー、ガン胚抗原プロモーター／エンハンサー、チロシンプロモーター／エンハンサーおよび前立腺特異的抗原プロモーター／エンハンサーを包含する。これらの遺伝子調節領域の各々は特異的腫瘍細胞タイプにおいて優先的に機能する。例えばアルファ<sub>1</sub>-フェトプロテインプロモーター／エンハンサーは肝細胞性ガン腫瘍細胞

において優先的に機能する。ガン胚抗原プロモーター／エンハンサーは結腸ガンおよび乳腫瘍細胞において優先的に機能し、一方、前立腺特異的抗原プロモーター／エンハンサーは前立腺腫瘍細胞において優先的に機能する。最後にチロシンプロモーター／エンハンサーは黒色腫瘍細胞において優先的に機能する。従って、本発明は、例えば乳ガン、結腸直腸ガン、肝細胞性ガン腫および黒色腫ガンを包含するガンの処置を提供する。

複製受容性ベクターの投与は当業者に十分に公知の方法により行われる。そのような投与は単独でも、許容し得る薬学的媒体中であってもよい。

薬学的に許容し得る担体は、例えば組成物を安定化するか、または薬剤の吸収を向上させるか、もしくは低下させるように作用する生理学的に許容し得る化合物を含有し得る。生理学的に許容し得る化合物は、例えば炭水化物、例としてグルコース、ショ糖またはデキストラン、酸化防止剤、例としてアスコルビン酸またはグルタチオン、キレート剤、低分子量タンパク質または他の安定剤もしくは



賦形剤を包含し得る。他の生理学的に許容し得る化合物は湿潤剤、乳化剤、分散剤または保存剤を包含し、それらは微生物の増殖または作用を防止するために特に有用である。種々の保存剤が十分に公知であり、そして例えばフェノールおよびアスコルビン酸を包含する。当業者は生理学的に許容し得る化合物を包含する薬学的に許容し得る担体の選択が、例えばポリペプチドの投与

の経路および特定のポリペプチドの特別な生理-化学的特徴に依存することを知悉している。例えば、生理学的に許容し得る化合物、例えばアルミニウムモノステアレートまたはゼラチンが遅延剤として特に有用であり、対象に投与される薬剤組成物の吸収率を延長する。担体、安定剤または助剤のその他の例は参照により本明細書に編入されるMartin, Remington's Pharm. Sci., 15版 (Mack Publ. Co., Easton, 1975)に見出され得る。薬剤組成物はまた、所望するならば、リポソーム、ミクロスフェアまたは他のポリマー材中に含有され得る(参照により本明細書に編入されるGregoriadis, Liposome Technology, Vol. 1 (CRC Press, Boca Raton, Florida 1984))。リポソームは、例えばリン脂質または他の脂質からなり、無毒性で生理学的に許容し得る、そして代謝可能な担体であり、製造および投与が比較的容易である。

複製受容性ベクターは、上記薬学的に許容し得る担体1種またはそれ以上と組み合わせた上記のベクターを包含する薬剤組成物として投与され得る。該組成物は次いで治療のため、または予防のために投与され得る。本発明のベクターを含有する薬剤を投与する方法は当業者に十分に公知であり、そして経口投与、腫瘍内投与、静脈内投与、筋肉内投与または腹膜内投与を包含するが、それに限定されない。投与は連続的にまたは断続的に行われ得、そして対象および処置されるべき状態、例えば他の治療組成物との併用の場合によって変わる (Landmann

等(1992); Aulitzky等(1991); Lantz等(1990); Supersaxo等(1988); Demtri等(1989);およびLeMaistre等(1991))。

本発明の種々の態様の活性に実質的に影響を与えない変更は本明細書に記載の本発明の定義内に包含される。従って、以下の実施例は本発明を説明するための

ものであり、限定するものではない。

#### 実施例 1

野生型アデノウイルス5型とは2つの様式で異なっている組換えアデノウイルスベクターが構築された。第1に、355と483に相当するAd5の間に含有するE1aプロモーターが切除され、そしてアルファフエトプロテイン (AFP) エンハンサー／プロモーターをコードする1.7kb断片で置き換えた。第2に、28583と30470に相当するAd5の間のE3領域が切除され、そしてその代わりにHSV-1 TK遺伝子を挿入した。E3において切除されたDNAはウイルス複製には必須のものではない。組換えウイルスベクターはそのAFP制御要素の故に、AFPガン細胞において優先的に複製する。これは、E3において含有される治療遺伝子、本実施例においてはHSV-1 TKの効果が、腫瘍特異的プロモーターが活性化される細胞中で優先的に増幅されるのを可能にする。AFPプロモーターは肝細胞性ガン腫ならびに他のガンにおいて活性化され、そしてこの組換え複製受容性アデノウイルスベクターはこ

れらのガンを処置する手段を提供する。同時に、腫瘍特異的プロモーターが、他の腫瘍タイプにおいてウイルスを増幅するためにAFPエンハンサー／プロモーターの代わりに挿入され得る。このウイルスは浸透によるか、または腫瘍内注入のいずれかにより投与され得る。それは自己複製性であるので、少量のみのウイルスのみが腫瘍細胞の治療を開始するために必要とされる。

方法—全てのプラスミドおよびウイルス構築物は標準的方法 (Sambrook等1989, GrahamおよびPrevec, 1991) を用いて構築された。

組換えプラスミド構築物—E1領域。腫瘍特異的プロモーターの制御下にE1a遺伝子を置くために、プラスミドが標準的方法を用いて構築された。プラスミドpcDNA3 Ad2 E1はアデノウイルス2型E1a遺伝子を市販されて利用可能なベクターpcDNA3 (Invitrogen Corp.) 中にクローニングすることにより構築された。E1a遺伝子は下記のプライマーを用い純粋なAd2 DNA (Gibco/BRL) に対してポリメラーゼ連鎖反応により単離された：

5' Ela PCR プライマー: CTG AAG CTT GAG TTC CTC AAG AGG CCA  
CTC  
3' Ela PCR プライマー: GCG CTC GAG ATT TAA CAC GCC ATG CAA  
GTT

1189bp Ela PCR生成物は1%アガロースゲル上を走行され、そしてバンドがカミソリ刃により

切り出され、そしてGeneclean II(Biol01 Inc.)により寒天から精製された。精製されたPCR生成物は次にXhoIおよびHindIIIで消化され、そしてpcDNA3のHindIIIおよびXhoI部位中にクローニングされ、pcDNA3 Ad2 Elaが生成された。プラスミドpAd/AFB/Bはアデノウイルス移送ベクターp1TRBのXおよびY部位間にアルファファクトプロテインエンハンサー/プロモーターをクローニングすることにより構築された。このベクターは下に記載されるpAANTKに対して同様に構築された。pAd/AFB/Elaを構築するために、Ad2 Ela遺伝子がpcDNA3からHindIII (クレノウポリメラーゼでプラント化) /NcoI制限断片として単離され、そしてXbaI (クレノウポリメラーゼでプラント化) とNcoI部位との間のpAd/AFB/B内のAFPプロモーターに隣接して挿入された。

組換えプラスミド構築物-E3領域。アデノウイルスE3領域に細胞毒性遺伝子のような治療遺伝子を挿入するために、下に記載されるようにプラスミドpSE280-E3デルタを構築した。構築物はpSE280 (Invitrogen Corp.) のEcoRIとSmaI部位との間の26045ないし38711に相当するAd5ヌクレオチドに対応するAd5制限断片 (MunI/DraI) をクローニングすることにより生成された。得られるプラスミドpSE280 E3 5' は次に制限酵素NheIおよびSnaBIで切

断され、そしてAd5ヌクレオチド30471-33756に相当するアデノウイルスDNA (XbaI/EcoRV) の第2の制限断片が挿入された。得られたプラスミドpSE280 E3デルタは28711-30471に相当するアデノウイ

ルスに対応する欠失を除くアデノウイルスE3領域を含有する。これらの配列はアデノウイルス複製には必須でなく、そして外来遺伝子はその領域に挿入され得る。この領域にTK遺伝子を挿入するために、TK遺伝子のPCRにより単離され、そしてXbaIおよびBamHI制限部位によりフランキングされたTK遺伝子断片がpAANTKに対するポリメラーゼ連鎖反応により単離され、そしてpSE280-E3デルタのXbaIおよびBamHI部位中にクローニングされてpSE280/E3デルタ/TKが生成された。

pAANTKに類似しているプラスミドpACNTKはpMLBKTk (ATCC番号39369)からのHSV-TK遺伝子をクローニングベクターのポリリンカー中にサブクローニングし、次にpACNベクター中へのクローニングのための所望の末端部でTK遺伝子の単離を行うことにより構築された。pACNベクターは生体内組換えのために必要なアデノウイルス配列を含有し、組換えアデノウイルスの形成を生じる。プラスミドpAANTKの構築は、AFPエンハンサーおよびプロモーターがHSV-TK遺伝子の上流にあり、組換えアデノウイルスの形成を生じるために生体内組換えに必要なア

デノウイルス2型配列がそれに続いている最終プラスミド中にいくつかの段階によりサブクローニングされた $\alpha$ -フェトプロテインエンハンサー (AFP-E) およびプロモーター (AFP-P) 領域をコードする断片のPCR増幅を必要とした。

組換えアデノウイルスの構築-E1aプロモーターが腫瘍特異的プロモーターにより置換された組換えアデノウイルスを生成するために、プラスミドpAd/AFP/E1aは制限酵素ClaIで切断され、そして次いでこれもまたClaIで切断されたアデノウイルスd1309 (JonesおよびShenk, 1979) に連結された。この連結されたDNAは293の細胞をトランスフェクションするために使用され、そして得られたウイルスブランクはAFPプロモーターの挿入のための制限分析によりスクリーニングされた。得られたウイルスはrAd-AFP-E1a/309と呼ばれる。HSV-1 TK遺伝子は次に、このウイルスのDNAを制限酵素EcoRIおよびSrfIで切断し、そして次にウイルスDNAをBstE11およびKpn

1で切断された pSE280-E3デルタ/TK DNAを有する293の細胞中に共トランスフェクションすることにより、Ad-AFP-E1a/309のE3領域中に置換された。生体内組換えから得られた組換えウイルスプラークは単離され、そしてE3領域中に挿入されたTK遺伝子の存在に対して制限分析によりスクリーニングされた。

#### ウイルス複製の分析

He p 3 B (AFP陽性HCC細胞株) およびHLE (AFP陰性細胞株) の  $1 \times 10^6$  が10 cm組織培養皿中に播種された。24時間後、細胞をrAd/AFP-E1a-TKまたはd1327にMOI 1で感染させた。ウイルスDNAは24時間、48時間および5日の後感染後に感染細胞から集められた。ウイルスDNAは以下のように分析のために調製された：

1. 細胞媒体を除去し、そしてHBSS緩衝液で1回洗浄する。
2.  $1 \times$  トリプシン-EDTAで細胞をトリプシン処理する。
3. ベックマンTJ-6卓上遠心分離機内、速度6で5分間細胞をペレット化する。
4. 氷冷PBSで細胞ペレットを2回再懸濁する。
5. Hirt溶菌緩衝液 [ $10 \text{ mM}$  トリス ( $\text{pH } 7.5$ ),  $10 \text{ mM}$  EDTA,  $0.6\%$  SDS]  $650 \mu\text{l}$  および  $5 \text{ M}$  NaCl  $163 \mu\text{l}$  を各細胞ペレットに対して添加する。 $-20^\circ\text{C}$  で1時間保温する。
6. 微量遠心分離機内で30分間室温で試料を回転する。上澄みを微量遠心分離管に移す。
7. プロテイナーゼKを  $200 \mu\text{g/ml}$  まで添加し、そして管を  $37^\circ\text{C}$  で1時間保温する。
8. ウイルスDNAを等容量のフェノール：クロロホルム／イソアミルアルコール (49 : 1) で1回、次に等

容量のクロロホルムで1回抽出する。

9. ウイルスDNAを2容量の  $100\%$  エタノールで沈澱させ、そしてペレット

を70%エタノールで洗浄する。

10. TE (pH 8.0) 29マイクロリットル中にペレットを再懸濁する。

各ウイルスDNA試料10マイクロリットルが制限エンドヌクレアーゼXhoIで37℃にて消化された。消化されたDNA試料は0.8%アガロースゲル上を20vで一晩走行された。消化されたDNAはゲルからナイロン膜へストラタジーン・ポジプロット・プレッシャー・プロッターを用いて移された。アデノウイルス複製を検定するために、膜は、Ad2の1711-2266に相当する配列を含有する32-Pプローブで探針された。プロットはホスホイメージャースクリーンに1時間暴露され、そしてオートラジオグラフ画像が得られ、そしてモレキュラー・ダイナミクス・ホスホリメジャーを用いて定量された。各細胞株に対する複製データは当該細胞株中の野生型ウイルスd1327の複製に対して比較された。

#### 結果

rAd/AFP-E1a-TKの複製能力を評価するために、ウイルスはAFPプロモーターを利用する(Hep-3B)か、またはこのプロモーターを利用しない(HLE)細胞株に感染させるために使用された。1の感染多重度での初期感染の後、ウイルスDNAは1、2

または5日後に集められ、そしてサザンプロット分析により分析され、そしてモレキュラー・ダイナミクス・ホスホリメジャーを用いて定量された。対照および標準として、細胞はまた、複製受容性アデノウイルスd1327に感染させた。d1327はrAd/AFP-E1a-TKにおいて欠失されていたE3の同じ非必須断片が欠失されている野生型アデノウイルスであり、そしてそれ故にウイルス複製の適当な対照として作用する。各々2つの細胞株においてrAd/AFP-E1a-TKの複製をd1327のものと比較することにより、ウイルスE1aプロモーターをAFPプロセター/エンハンサーで置換することによる効果を評価することが可能である。これらの実験は、この置換が、AFP陰性HLE細胞株中のd1327に比べ、rAd/AFP-E1a-TKを複製不利にすることを示した。一方、rAd/AFP-E1a-TKはAFP陽性腫瘍細胞株

において、はるかに効率よく複製した。調節は絶対的ではないけれども、AFP陽性細胞株において、陰性細胞株におけるより、4ないし5倍複製が有利であった。

本発明は開示された態様を参照して記載されてきたが、当業者は述べられた特定の実験が本発明を説明するためのみのものであることを容易に理解する。種々の変形が本発明の精神を逸脱することなしになされ得ることは理解されるべきである。従って、本発明は以下の請求の範囲によってのみ限定される。

【図1】

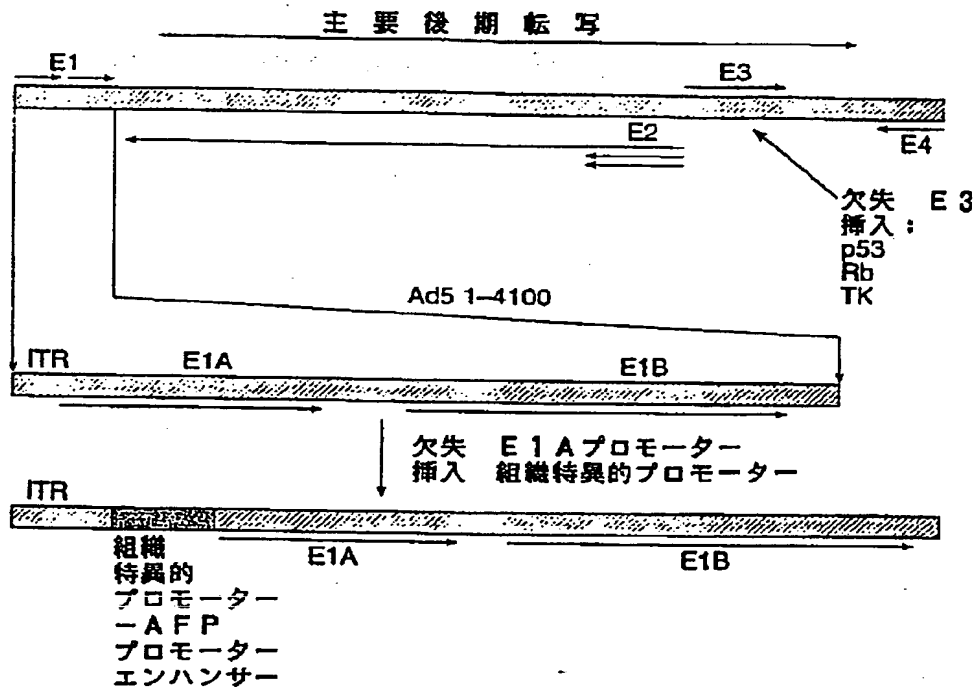


FIG. 1

【図2】

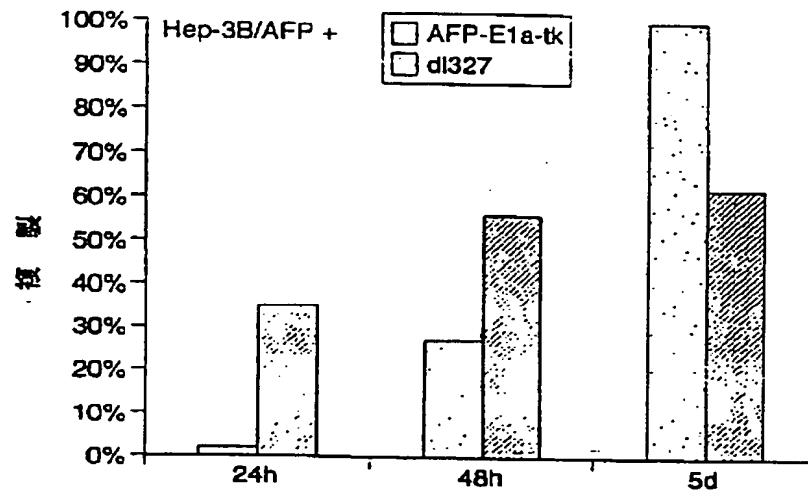


FIG. 2A

【図2】

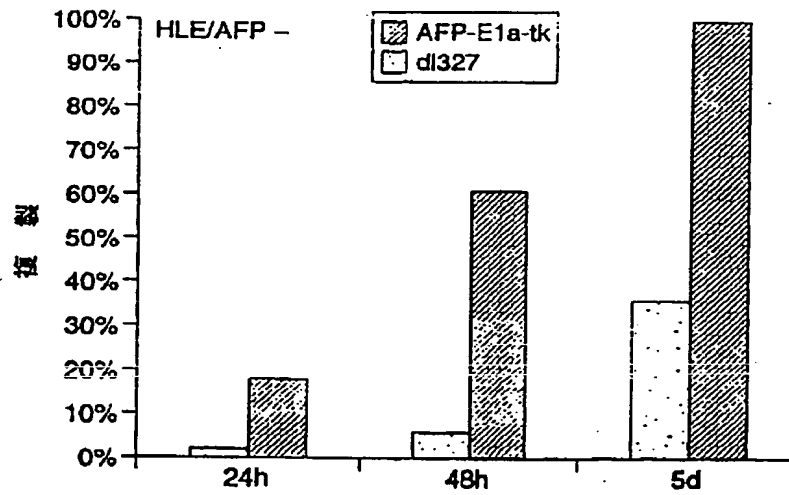


FIG. 2B



【図3】

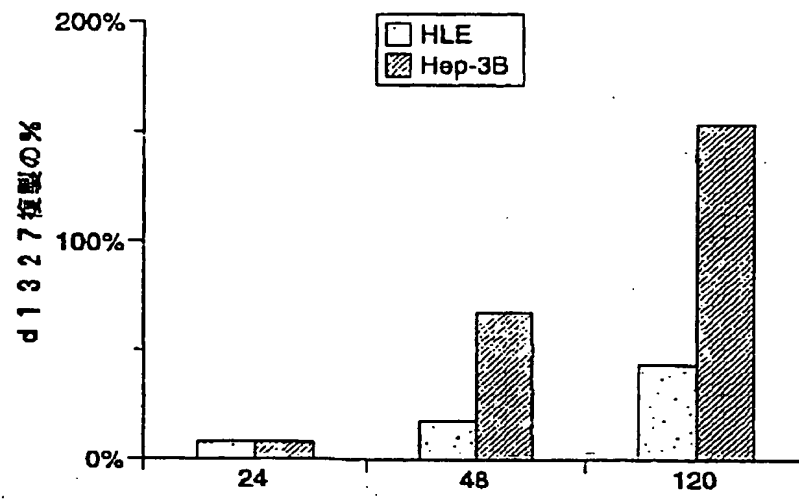


FIG. 3

## 【手続補正書】

【提出日】1998年10月2日

## 【補正内容】

「

## 請求の範囲

1. 少なくとも1つのアデノウイルス複製遺伝子に操作可能に連結された疾病特異的遺伝子調節領域を含む複製受容性アデノウイルスベクターを哺乳類の疾病細胞に投与することからなる該細胞中にアデノウイルスベクターを優先的に複製する方法であって、該疾病細胞は疾病特異的遺伝子調節領域を活性化しアデノウイルスベクターの複製を引き起こす、上記方法。
2. 上記細胞が哺乳類に存在する請求項1記載の方法。
3. 疾病特異的遺伝子調節領域がアルファ-フェトプロテインプロモーター/エンハンサーである請求項1記載の方法。
4. 疾病細胞が肝細胞性ガン腫細胞である請求項2記載の方法。
5. 疾病特異的遺伝子調節領域がガン胚抗原プロモーター/エンハンサーである請求項1記載の方法。
6. 哺乳類の疾病細胞が乳ガン細胞である請求項5記載の方法。
7. 哺乳類の疾病細胞が結腸直腸ガン細胞である請求項5記載の方法。
8. 疾病特異的調節領域が前立腺特異的抗原プロモーター/エンハンサーである請求項1記載の方法。
9. 哺乳類の疾病細胞が前立腺ガン細胞である請求項8記載の方法。
10. 疾病特異的遺伝子調節領域がチロシナーゼプロモーター/エンハンサーである請求項1記載の方法。
11. 哺乳類の疾病細胞が黒色腫ガン細胞である請求項10記載の方法。
12. アデノウイルスベクターが治療遺伝子をさらに含有する請求項1記載の方法。
13. 治療遺伝子が致死遺伝子である請求項12記載の方法。
14. 治療遺伝子が腫瘍サプレッサー遺伝子である請求項12記載の方法。
15. 上記腫瘍サプレッサー遺伝子がp53、p21、p53突然変異体、p16およびウィルムス腫瘍WT1タンパク質からなる群から選択される請求項14

記載の方法。

16. 複製遺伝子がアデノウイルスE1遺伝子である請求項1記載の方法。

17. 複製遺伝子がE1a遺伝子である請求項16記載の方法。

18. 複製遺伝子がアデノウイルスE2遺伝子である請求項1記載の方法。

19. 複製遺伝子がアデノウイルスE4遺伝子である請求項1記載の方法。

20. 少なくとも1つのアデノウイルス複製遺伝子に操作可能に連結された疾病特異的遺伝子調節領域を含む複製受容性アデノウイルスベクターであって、該アデノウイルスベクターは、前記疾病特異的遺伝子調節領域が活性である疾病細胞中に存在する場合に誘導されて複製する上記複製受容性アデノウイルスベクター。

21. 疾病特異的遺伝子調節領域がアルファーフエトプロテインプロモーター／エンハンサーである請求項20記載の複製受容性アデノウイルスベクター。

22. 疾病特異的遺伝子調節領域がガン胚抗原プロモーター／エンハンサーである請求項20記載の複製受容性アデノウイルスベクター。

23. 疾病細胞がガン細胞である請求項20記載の複製受容性アデノウイルスベクター。

24. ガン細胞が肝細胞性ガン腫細胞、乳ガン細胞、結腸直腸ガン細胞、前立腺ガン細胞および黒色腫ガン細胞からなる群から選択される請求項23記載の複製受容性アデノウイルスベクター。

25. 疾病特異的調節領域が前立腺特異的抗原プロモーター／エンハンサーである請求項20記載の複製受容性アデノウイルスベクター。

26. 疾病特異的遺伝子調節領域がチロシナーゼプロモーター／エンハンサーである請求項20記載の複製受容性アデノウイルスベクター。

27. ベクターが治療遺伝子をさらに含有する請求項20記載の複製受容性アデノウイルスベクター。

28. 治療遺伝子が致死遺伝子である請求項27記載の複製受容性アデノウイルスベクター。

29. 致死遺伝子がチミジンキナーゼ遺伝子である請求項28記載の複製受容性

アデノウイルスベクター。

30. 治療遺伝子が腫瘍サプレッサー遺伝子である請求項27記載の複製受容性アデノウイルスベクター。

31. 腫瘍サプレッサー遺伝子がp53、p21、p53突然変異体、p16およびウィルムス腫瘍WT1タンパク質からなる群から選択される請求項30記載の複製受容性アデノウイルスベクター。

32. 複製遺伝子がアデノウイルスE1遺伝子である請求項20記載の複製受容性アデノウイルスベクター。

33. 複製遺伝子がE1a遺伝子である請求項32記載の複製受容性アデノウイルスベクター。

34. 複製遺伝子がアデノウイルスE2遺伝子である請求項20記載の複製受容性アデノウイルスベクター。

35. 複製遺伝子がアデノウイルスE4遺伝子である請求項20記載の複製受容性アデノウイルスベクター。

36. 治療遺伝子が免疫モジュレーター遺伝子である請求項27記載の複製受容性アデノウイルスベクター。

37. 免疫モジュレーター遺伝子がサイトカインをコードする請求項36記載の複製受容性アデノウイルスベクター。」

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N15/86 A61K48/00		International Application No. PC1/US 96/06199
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	WO,A,96 17053 (GENETIC THERAPY INC ;HALLENBECK PAUL L (US); CHANG YUNG NIEN (US);) 6 June 1996 see the whole document ---	1-18
A	WO,A,94 18992 (ONYX PHARMACEUTICALS) 1 September 1994 see the whole document --- -/--	1-18
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 26 September 1996		Date of mailing of the international search report 18. 10. 96
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5218 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-3040, Tx. 31 65t epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016		Authorized officer Hornig, H

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 96/06199

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	J. VIROLOGY, vol. 57, no. 1, January 1986, AM.SOC.MICROBIOL.,WASHINGTON,US, pages 267-274, XP002014457 Y.-HAJ-AHMAD AND F.L. GRAHAM: "Development of a helper-independent human adenovirus vector and its use in the transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene" see the whole document ---	1-18
A	PROC. NATL.ACAD.SCI., vol. 84, July 1987, NATL. ACADEMY OF SCI.,WASHINGTON,DC,US;, pages 4626-4630, XP002014458 J.E. MORIN ET AL.: "Recombinant adenovirus induces antibody response to hepatitis B virus surface antigen in hamster" see the whole document ---	1-18
A	J. INFECTIOUS DISEASES, vol. 161, 1990, UNIVERSITY OF CHICAGO, US, pages 27-30, XP002014459 L. PREVEC ET AL.: "A recombinant human adenovirus vaccine against rabies" see the whole document ---	1-18
A	J. GENERAL VIROLOGY, vol. 76, no. 1, January 1995, READING, BERKS, GB, pages 93-102, XP002014460 S.K. MITTAL ET AL.: "Development of a bovine adenovirus type 3-based expression vector" see the whole document ---	1-18
P,A	WO,A,95 11984 (CANJI INC) 4 May 1995 see the whole document -----	1-18

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 96/06199

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 1-18  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Remark: Although these claims are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. Patent Application No.

PCT/US 96/06199

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9617053	06-06-96	AU-A- 4504396	19-06-96
WO-A-9418992	01-09-94	AU-A- 6272294	14-09-94
		CA-A- 2152941	01-09-94
		EP-A- 0689447	03-01-96
		JP-T- 8507076	30-07-96
WO-A-9511984	04-05-95	AU-A- 8125094	22-05-95
		CA-A- 2173975	04-05-95
		NO-A- 961639	24-06-96
		AU-A- 2637295	18-12-95
		WO-A- 9532720	30-11-95
		US-A- 5534 15	09-07-96



---

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, LS, MW, SD, SZ, UG), UA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN



## INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification <sup>6</sup> : C12N 15/86, A61K 48/00	A2	(11) International Publication Number: <b>WO 96/34969</b> (43) International Publication Date: 7 November 1996 (07.11.96)
---	----	--

(21) International Application Number: PCT/US96/06199

(22) International Filing Date: 2 May 1996 (02.05.96)

(30) Priority Data:  
08/433,798 3 May 1995 (03.05.95) US

(71) Applicant: CANJI, INC. [US/US]; Suite 302, 3030 Science Park Road, San Diego, CA 92121 (US).

(72) Inventors: GREGORY, Richard, J.; 4789 Gateshead Road, Carlsbad, CA 92008 (US). HUANG, Whei-Mei; 12295 Pierus Street, San Diego, CA 92120 (US).

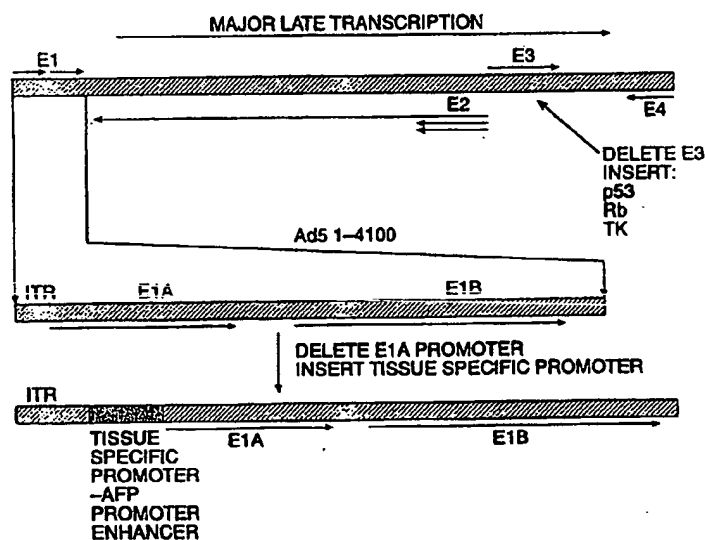
(74) Agents: FITTS, Renee, A. et al.; Townsend and Townsend and Crew L.L.P., 8th floor, Two Embarcadero Center, San Francisco, CA 94111 (US).

(81) Designated States: AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, ARIPO patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

## Published

*Without international search report and to be republished upon receipt of that report.*

(54) Title: GENE THERAPY USING REPLICATION COMPETENT TARGETED ADENOVIRAL VECTORS



## (57) Abstract

This invention provides a method of treating cancer by administering a replication competent adenoviral vector comprising a therapeutic gene and a disease specific gene regulatory region operationally linked to at least one replication gene. The replication competent targeted adenoviral vector preferentially replicates in the tumor cells following activation of the tumor specific gene regulatory region thereby amplifying the effect of the therapeutic gene carried by the replication competent adenoviral vector. This invention enables for the first time the targeting of a therapeutic gene for treating cancer using small amounts of viral vectors which selectively replicate to deliver therapeutic dosages of the therapeutic gene.

**FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY**

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AM	Armenia	GB	United Kingdom	MW	Malawi
AT	Austria	GE	Georgia	MX	Mexico
AU	Australia	GN	Guinea	NE	Niger
BB	Barbados	GR	Greece	NL	Netherlands
BE	Belgium	HU	Hungary	NO	Norway
BF	Burkina Faso	IE	Ireland	NZ	New Zealand
BG	Bulgaria	IT	Italy	PL	Poland
BJ	Benin	JP	Japan	PT	Portugal
BR	Brazil	KE	Kenya	RO	Romania
BY	Belarus	KG	Kyrgyzstan	RU	Russian Federation
CA	Canada	KP	Democratic People's Republic of Korea	SD	Sudan
CF	Central African Republic	KR	Republic of Korea	SE	Sweden
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapore
CH	Switzerland	LI	Liechtenstein	SI	Slovenia
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovakia
CM	Cameroon	LR	Liberia	SN	Senegal
CN	China	LT	Lithuania	SZ	Swaziland
CS	Czechoslovakia	LU	Luxembourg	TD	Chad
CZ	Czech Republic	LV	Latvia	TG	Togo
DE	Germany	MC	Monaco	TJ	Tajikistan
DK	Denmark	MD	Republic of Moldova	TT	Trinidad and Tobago
EE	Estonia	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Spain	ML	Mali	UG	Uganda
FI	Finland	MN	Mongolia	US	United States of America
FR	France	MR	Mauritania	UZ	Uzbekistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

GENE THERAPY USING REPLICATION COMPETENT TARGETED  
ADENOVIRAL VECTORS

BACKGROUND OF THE INVENTION

The present invention relates generally to gene  
5 therapy methods for the treatment of diseases and, more  
particularly cancer, through administration of a  
replication competent targeted virus comprising a  
therapeutic gene and a tumor specific enhancer/promoter  
upstream of an essential viral gene wherein the cancer  
10 cell activates the tumor specific promoter causing the  
virus to replicate thereby amplifying the cytotoxic  
effect of the therapeutic gene.

The goal of gene therapy in treating abnormal  
pathological conditions such as cancer is to reestablish  
15 the normal control of cellular proliferation or to  
eliminate the cells undergoing aberrant proliferation.  
There are three primary strategies by which *in vivo*  
genetic modification can lead to therapeutic benefit.  
These strategies include the enhancement of  
20 immunogenicity toward the aberrant cells, the correction  
of a genetic defect which leads to the aberrant phenotype  
and the delivery of a gene whose product is or can be  
made toxic to the recipient cells. Of all three  
strategies, the one most likely to provide the greatest  
25 benefit with the least side effects is to deliver the  
vector carrying the therapeutic gene to as many cells as  
possible while controlling the functional delivery of the  
therapeutic gene to the abnormally proliferating cells.

A specific example of correcting a genetic  
30 defect to reinstate control of normal cellular  
proliferation using, for example, p53 mediated gene  
therapy. p53 plays a central role in cell cycle

progression, arresting growth so that repair or apoptosis can occur in response to DNA damage. Wild-type p53 has recently been identified as a necessary component for apoptosis induced by irradiation or treatment with some  
5 chemotherapeutic agents (Lowe et al. (1993) A and B). Due to the high prevalence of p53 mutations in human tumors, it is possible that tumors which have become refractory to chemotherapy and irradiation treatments may have become so due in part to the lack of wild-type p53.  
10 By providing functional p53, these tumors are susceptible to apoptosis normally associated with the DNA damage induced by radiation and chemotherapy.

As with treating p53 deficient tumors, gene therapy is equally applicable to other tumor suppressor  
15 genes which can be used either alone or in combination with therapeutic agents to control cell cycle progression of tumor cells and/or induce cell death. Moreover, genes which do not encode cell cycle regulatory proteins, but directly induce cell death such as suicide genes or,  
20 genes which are directly toxic to the cell can be used in gene therapy protocols to directly eliminate the cell cycle progression of tumor cells.

Regardless of which gene is used to reinstate the control of cell cycle progression, the rationale and  
25 practical applicability of this approach is identical. Namely, to achieve high efficiencies of gene transfer to express therapeutic quantities of the recombinant product. The choice of which vector to use to enable high efficiency gene transfer with minimal risk to the  
30 patient is therefore important to the level of success of the gene therapy treatment.

One of the critical points in successful gene therapy of cancer or certain other diseases is the ability to affect a significant fraction of the aberrant cells. The use of retroviral vectors has been largely  
5 explored for this purpose in a variety of tumor models. For example, in the treatment of hepatic malignancies, retroviral vectors have been employed with little success because these vectors are not able to achieve the high level of gene transfer required for *in vivo* gene therapy  
10 (Huber, B.E. et al., 1991; Caruso M. et al., 1993).

To achieve a more sustained source of virus production, researchers have attempted to overcome the problem associated with low level of gene transfer by direct injection of retroviral packaging cell lines into  
15 solid tumors (Caruso, M. et al., 1993; Ezzidine, Z.D. et al., 1991; Culver, K.W. et al., 1992). However, these methods are unsatisfactory for use in human patients because the method is troublesome and induces an inflammatory response against the packaging cell line in  
20 the patient. Another disadvantage of retroviral vectors is that they require dividing cells to efficiently integrate and express the recombinant gene of interest (Huber, B.E. 1991). Stable integration into an essential host gene can lead to the development or inheritance of  
25 pathogenic diseased states.

Recombinant adenoviruses have distinct advantages over retroviral and other gene delivery methods (for review, see Siegfried (1993)). Adenoviruses have never been shown to induce tumors in humans and have  
30 been safely used as live vaccines (Straus (1984)). Replication deficient recombinant adenoviruses can be produced by replacing the E1 region necessary for replication with the target gene. Adenovirus does not

integrate into the human genome as a normal consequence of infection, thereby greatly reducing the risk of insertional mutagenesis possible with retrovirus or adeno-associated viral (AAV) vectors. This lack of  
5 stable integration also leads to an additional safety feature in that the transferred gene effect will be transient, as the extrachromosomal DNA will be gradually lost with continued division of normal cells. Stable, high titer recombinant adenovirus can be produced at  
10 levels not yet achievable with retrovirus or AAV, allowing enough material to be produced to treat a large patient population. Moreover, adenovirus vectors are capable of highly efficient *in vivo* gene transfer into a broad range of tissue and tumor cell types. For example,  
15 others have shown that adenovirus mediated gene delivery has a strong potential for gene therapy for diseases such as cystic fibrosis (Rosenfeld et al. (1992); Rich et al. (1993)) and  $\alpha_1$ -antitrypsin deficiency (Lemarchand et al. (1992)). Although other alternatives for gene delivery,  
20 such as cationic liposome/DNA complexes, are also currently being explored, none as yet appear as effective as adenovirus mediated gene delivery. Adenoviral vectors currently being tested for gene therapy applications typically are deleted for Ad2 or Ad5 DNA to render them  
25 replication incompetent.

Although adenoviral vectors offer several advantages over other modes of gene delivery vehicles, they still exhibit some characteristics which impose limitations to their efficient use *in vivo*. These  
30 limitations primarily result in the limited ability of the vectors to efficiently deliver and target therapeutic genes to the tumor deposits. Researchers have attempted to circumvent this problem by administering large quantities of the delivery agent into the tumor

environment but this is unlikely to be feasible when treating a dispersed metastatic disease. Recently it has been proposed that a solution to this issue might lie in the use of viral vectors which would retain the ability to replicate in tumor tissue and thereby amplify the effect of any therapeutic gene carried by the virus (S.J. Russell., 1994, European Journal of Cancer 8, 1165-1171). The potential use of replicating viruses in the treatment of cancer has a long history (Id.) and a great many virus types have been used in experimental trials as cancer therapeutics with no significant success.

Thus, there exists a need for methods which specifically target the therapeutic gene to the abnormally proliferating cells and also allow high copy numbers of the therapeutic gene to achieve greater efficacy by enabling efficient penetration of the diseased tissue. The present invention satisfies this need and provides related advantages as well.

#### SUMMARY OF THE INVENTION

This invention provides a method of treating cancer by administering a replication competent adenoviral vector comprising a therapeutic gene and a disease specific gene regulatory region operationally linked to at least one replication gene. The replication competent targeted adenoviral vector preferentially replicates in the tumor cells following activation of the tumor specific gene regulatory region thereby amplifying the effect of the therapeutic gene carried by the replication competent adenoviral vector. This invention enables for the first time the targeting of a therapeutic gene for treating cancer using small amounts of viral



vectors which selectively replicate to deliver therapeutic dosages of the therapeutic gene.

#### BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1. Schematic Representation of  
5 rAd/AFP-Ela/TK. Adenovirus type 5 sequences containing the Ela promoter between nucleotides 355 and 483 have been deleted and replaced with a 1.7 kb fragment containing the alpha-fetoprotein enhancer/promoter. In addition Adenovirus type 5 sequences in the E3 region  
10 between Ad5 coordinates 28583 and 30470 have been deleted and in their place is inserted a 1130 base pair fragment corresponding to the HSV-1 thymidine kinase gene.

Figure 2. Replication of rAd/AFP-Ela/TK in hepatocellular carcinoma (HCC) cell lines.  
15 rAd/AFP-Ela/TK and the replication competent control virus dl327 were used to infect two HCC cell lines. D1327 is deleted for the same region of E3 deleted in rAd/AFP-Ela/TK but contains the normal Ela promoter region. This Hep 3D cell line produces alpha-fetoprotein  
20 while the HLE cell line does not. Replication was assessed by isolating viral DNA and performing Southern blot analysis at the indicated timepoints. Replication, as assessed by radioactive probes, was measured using a Molecular Dynamics Phosphorimager. Results are normalized  
25 to the replication of the control virus dl327 in these cell lines. A) Replication of rAd/AFP-Ela/TK replication in Hep-3B cells. B) Replication of rAd/AFP-Ela/TK in HLE cells.

Figure 3. Comparison of AD/AFP-Ela/TK  
30 replication in Hep-3B (AFP positive) vs HLE (AFP)

negative cell lines normalized to replication of dl327 virus at each timepoint. rAd/AFP-Ela/TK replicates preferentially in AFP positive HCC cells.

#### DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

5           This invention is directed to gene therapy and to the use of disease specific replication competent adenoviral vectors for selectively expressing therapeutic genes at a particular site of interest, namely within a cancer cell. The use of replication competent vectors is  
10 advantageous in that therapeutic genes can initially be delivered to a small number of tumor cells where they are amplified by viral replication and able to be transferred to adjacent cells. Thus, the replication increases the overall efficiency of the gene delivery step and thus,  
15 increases the efficacy of the gene therapy protocol. The normal immune system of the host will prevent spread of virus throughout the body.

          In one embodiment, the invention is directed to the therapeutic use of engineered replication competent  
20 recombinant adenoviruses to treat cancer and other hyperproliferative disorders or diseases in which there is a unique factor substance which would allow targeted delivery of a therapeutic substance using the method of this invention. The viruses have been modified to reduce  
25 their ability to replicate in normal cells while retaining their ability to replicate efficiently in specific tumor types. The adenoviral vectors include therapeutic genes such as cytotoxic genes or tumor suppressor genes which are lethal or otherwise render the  
30 cancer non-malignant or anti-sense compounds to certain viruses such as hepatitis or cytomegalovirus, or anti-viral compounds such as interferon-alpha. The tumor

specific replication competent vectors have been engineered such that the promoter of the adenoviral Ela gene has been replaced with a tumor specific promoter/enhancer. An important distinction between these  
5 recombinant viruses and those typically used for gene therapy is that a replication gene such as the E1 gene, themselves are retained in the resulting recombinant adenoviruses. Because the viral E1 gene controls transcription of many other important viral genes  
10 (Horowitz, 1990) this modification restricts virus replication to those tumors which utilize the tumor specific promoter/enhancer inserted in place of the Ela promoter. One example of a cytotoxic gene is the Herpes simplex type-1 thymidine kinase gene which itself has a  
15 selective toxicity to replicating cells in the presence of the drug ganciclovir (F.L. Moolten, 1986). Replication of the recombinant adenovirus within the tumor mass amplifies the effect of the cytotoxic gene carried by the virus.

20 As used herein, the term "therapeutic gene" refers to a nucleic acid sequence which encodes a protein having a therapeutically beneficial effect such as regulating the cell cycle or inducing cell death. Examples of genes which regulate the cell cycle include  
25 p53, RB and mitotin whereas a gene which induces cell death includes the conditional suicide gene thymidine kinase. Cytokines which augment the immunological functions of effector cells are also included within the term as defined herein. Therapeutic genes are  
30 essentially foreign genes which are expressed from the replication competent adenoviral vectors used in the methods of the invention. These foreign genes are therefore DNA molecules which are not present in the exact orientation and position as the counterpart DNA

molecule found in wild-type adenovirus. The foreign gene can be a DNA molecule up to about 4.5 kilobases.

The therapeutically beneficial effects of such genes can be conferred by either a direct or indirect mode of action. For example, a therapeutic gene which acts directly can include those genes which are necessary for cell proliferation. Examples of such direct acting genes are the tumor suppressor genes and cell cycle regulatory genes. Examples of therapeutic genes which are beneficial through an indirect mode of action are genes which exhibit cytotoxic characteristics and immunomodulatory genes. Cytotoxic genes can be therapeutically beneficial either alone or when used in combination with other agents.

Included within the definition of the therapeutic genes of the invention are active fragments thereof and genes which contain minor modifications which do not significantly effect the intended function of the gene product. Thus, "active fragments" of therapeutic genes include smaller portions of the gene that retain the ability to encode proteins having therapeutic benefit. p56<sup>Rb</sup>, described more fully below, is but one example of an active fragment of a therapeutic gene which is a tumor suppressor gene. Modifications of therapeutic genes which are contemplated include nucleotide additions, deletions or substitutions, so long as the functional activity of the unmodified gene is retained. Thus, such modifications result in equivalent gene products that depart from the linear sequence of the naturally occurring proteins or polypeptides, but which have amino acid substitutions that do not change its biological activity. These equivalents can differ from the native sequences by the replacement of one or more

amino acids with related amino acids, for example, similarly charged amino acids, or the substitution or modification of side chains or functional groups.

As used herein, the term "operationally linking" refers to the joining of an encoding nucleic acid sequence to expression elements which results in the biological production of the desired polypeptide. Therefore, "expression elements," as used herein, refers to all nucleic acid elements which direct the proper transcription, processing, translation and sorting of a gene product from an encoding nucleic acid. Such elements can include, for example, promoters and regulatory elements such as the tumor specific promoter/enhancer as described herein, splicing sequences, translation initiation and termination sequences and signal sequences.

As used herein, the term "replication competent adenoviral vector" or "adenoviral vector" refers to vectors derived from the adenoviral genome which preferentially replicate in cancer cells and thus amplify the effect of the therapeutic gene carried by the virus. The replication of the vector is dependent on the presence of a factor(s) characteristic of the diseased tissue. The factor(s) trigger replication of the vector and in turn amplification of the therapeutic effect. The adenoviral vectors of this invention are engineered as described herein to reduce or eliminate their ability to replicate in normal cells while retaining their ability to replicate efficiently in specific tumor disease cell types.

As used herein, the term "tumor specific gene regulatory region" or "tumor specific regulatory region"

or "tumor specific promoter" or "tumor specific promoter/enhancer" refers to transcription and/or translation regulatory regions that function selectively or preferentially in a specific tumor cell type.

- 5 Selective or preferential function confers specificity to the gene therapy treatment since the therapeutic gene will be primarily expressed in a targeted or specific tumor cell type. Tumor specific regulatory regions include transcriptional, mRNA maturation signals and
- 10 translational regulatory regions that are tumor cell type specific. Transcriptional regulatory regions include, for example, promoters, enhancers and silencers. Specific examples of such transcriptional regulatory regions include the promoter/enhancer elements for alpha-
- 15 fetoprotein, carcinoembryonic antigen and prostate specific antigen. RNA processing signals include, for example, tissue specific intron splicing signals whereas translational regulatory signals can include, for example, mRNA stability signals and translation initiation
- 20 signals. Thus, tumor specific regulatory regions include all elements that are essential for the production of a mature gene product in a specific tumor cell type.

As used herein, the term "tumor suppressor gene" refers to a gene that encodes a protein that

25 effectively inhibits a cell from behaving as a tumor cell. A specific example of a tumor suppressor gene is the retinoblastoma (RB) gene. The complete RB cDNA nucleotide sequences and predicted amino acid sequences of the resulting RB protein (designated p110<sup>RB</sup>) are shown

30 in Lee et al. (1987). A truncated version of p110<sup>RB</sup>, called p56<sup>RB</sup> also functions as a tumor suppressor gene and is therefore useful as a therapeutic gene. The sequence of p56<sup>RB</sup> is described by Huang et al. (1991). Tumor suppressor genes other than RB include, for example, the

- p16 protein (Kamb et al. (1994)), p21 protein, Wilm's tumor WT1 protein, or colon carcinoma DCC protein or related molecules such as mitotin and H-NUC. Mitotin is described in Zhu and Lee, U.S. Application Serial No. 08/141,239, filed October 22, 1993, and a subsequent continuation-in-part by the same inventors, attorney docket number P-CJ 1191, filed October 24, 1994, both of which are herein incorporated by reference. Similarly, H-NUC is described by W-H Lee and P-L Chen, U.S. Application Serial No. 08/170,586, filed December 20, 1993, herein incorporated by reference.

Also encompassed within the definition of a tumor suppressor protein is any protein whose presence suppresses the neoplastic phenotype by reducing or eliminating the tumorigenicity, malignancy or hyperproliferative phenotype of the host cell. The neoplastic phenotype is characterized by altered morphology, faster growth rate, higher saturation density, growth in soft agar and tumorigenicity. The therapeutic genes described above encode proteins which exhibit this activity. "Tumorigenicity" is intended to mean having the ability to form tumors or capable of causing tumor formation and is synonymous with neoplastic growth. "Malignancy" is intended to describe a tumorigenic cell having the ability to metastasize and endanger the life of the host organism. "Hyperproliferative phenotype" is intended to describe a cell growing and dividing at a rate beyond the normal limitations of growth for that cell type. "Neoplastic" also is intended to include cells lacking endogenous functional tumor suppressor protein or the inability of the cell to express endogenous nucleic acid encoding a functional tumor suppressor protein.

As used herein, the term "cell cycle regulatory gene" refers to genes encoding proteins which directly or indirectly control one or more regulatory steps within the cell cycle. Such cell cycle regulatory steps include, for example, the control of quiescent to proliferative phenotypes such as the  $G_0$   $G_1$  transition as well as progression into apoptosis. Examples of cell cycle regulatory genes include the cyclins and cyclin dependent kinases.

As used herein, the term "immunomodulatory gene" refers to genes encoding proteins which either directly or indirectly have an effect on the immune system which augments the host's inherent response toward proliferating tumor cells. Such immunomodulatory genes include, for example, cytokines such as interleukins and interferons which are recognized by effector cells of the immune system.

As used herein, the term "cytotoxic gene" refers to a gene that encodes a protein which either alone or in combination with other agents is lethal to cell viability. Examples of cytotoxic genes which alone are lethal include toxins such as pertussis toxin, diphtheria toxin and the like. Examples of cytotoxic genes which are used in combination with other agents to achieve cell lethality include, for example, herpes simplex-1 thymidine kinase and cytosine deaminase. The subject is then administered an effective amount of a therapeutic agent, which in the presence of the anti-tumor gene is toxic to the cell. In the specific case of thymidine kinase, the therapeutic agent is a thymidine kinase substrate such as ganciclovir (GCV), 6-methoxypurine arabinonucleoside (araM), or a functional equivalent thereof. Both the thymidine kinase gene and



the thymidine kinase metabolite must be used concurrently to be toxic to the host cell. However, in its presence, GCV is phosphorylated and becomes a potent inhibitor of DNA synthesis whereas araM gets converted to the

5 cytotoxic anabolite araATP. Other anti-tumor genes can be used as well in combination with the corresponding therapeutic agent to reduce the proliferation of tumor cells. Such other gene and therapeutic agent combinations are known by one skilled in the art.

10 Another example would be the vector of this invention expressing the enzyme cytosine deaminase. Such vector would be used in conjunction with administration of the drug 5-fluorouracil (Austin and Huber, 1993), or the recently described E. Coli Deo  $\Delta$  gene in combination with

15 6-methyl-purine-2'-deosribonucleoside (Sorscher et al., 1994).

The invention provides a method of treating mammalian cancer cells. The method consists of administering a replication competent targeted adenoviral

20 vector comprising a therapeutic gene and a disease specific gene regulatory region operationally linked to at least one replication gene wherein the disease cells activate the disease specific gene regulatory region.

Contrary to what has been known in the art,

25 this invention claims the use of replication competent recombinant adenoviruses which selectively replicate at a selected site. Following infection the viral genome localizes to the cell's nucleus. Adenoviral replication then proceeds by initial transcription of the Ela gene.

30 The products of the Ela gene then activate transcription of the other early transcription units, Elb, E2, E3 and E4. These products initiate DNA synthesis at which point the major late transcription unit is activated leading to

synthesis of the major viral structural proteins and virus assembly in the nucleus.

The replication competent vectors of the invention are disease specific in that they replicate preferentially in the targeted tumor cell type. This tumor specific replication competence is achieved by operationally linking at least one gene for replication to a tumor specific gene regulatory region. Genes necessary for replication are any of those described above such as the Ela gene. Although other genes such as E2, E4 and the major late transcription unit can achieve tumor specific replication competence, the use of Ela is advantageous in that it also controls the expression of other adenoviral genes necessary for propagation. Thus, the invention provides for adenoviral vectors which retain the E1 genes and those which retain the Ela gene.

The replication competent adenoviral vectors useful in the methods of this invention can be modified so as to achieve a desired function for a particular need. Such modifications include additions, deletions or substitutions of adenoviral or exogenous sequences so as to augment the delivery and efficacy of the therapeutic gene. Further, adenoviral vectors based on any group C virus, serotype 1, 2, 5 and 6, can be used in the methods of this invention as well as vectors such as an Ad2/Ad5 based adenoviral vector.

The invention provides for therapeutic genes which are cytotoxic genes such as the conditionally lethal herpes simplex thymidine kinase gene. The invention also provides for therapeutic genes which are tumor suppressor genes. Examples of tumor suppressor genes include, for example, p53, RB, RB mutants, p21, p53

mutants or mitosis. Expression of such a therapeutic gene results in the restoration of the control of the cell cycle progression. The therapeutic genes can be under the control of a inducible promoter so that

5 preferential tissue specific expression relies on the tumor specific expression of an essential replication gene. Alternatively, the therapeutic genes can similarly be under the control of a tumor specific gene regulatory region. The combined tumor specific expression of both a

10 replication gene and the therapeutic gene is advantageous in that greater specificity is achieved and therefore greater efficacy of the methods are obtained.

Therapeutic genes which are cytotoxic can be directly lethal to achieve cell death of the targeted

15 tumor cells or they can be, for example, conditionally lethal such as suicide genes which are used in conjunction with an agent which is capable of becoming toxic when metabolized by the suicide gene. A specific example of such a suicide gene is the herpes simplex

20 thymidine kinase (TK) gene.

Expression cassettes can be incorporated into the replication competent vectors of the invention to allow greater flexibility to modify the vectors with a variety of genes necessary for a particular application.

25 An expression cassette is therefore a functional term to describe the ability of the vector to achieve the recombinant production of the therapeutic gene of interest.

The invention provides tumor specific

30 replication competent vectors wherein the gene regulatory regions are selected from the group consisting of the alpha-fetoprotein promoter/enhancer, the carcinoembryonic

antigen promoter/enhancer, the tyrosinase promoter/enhancer and the prostate specific antigen promoter/enhancer. For other diseases such as inflammatory conditions, the inducer could be TNF- $\alpha$  and  
5 the responding regulatory element the interleukin-6 (IL-6) promoter. The therapeutic gene can encode interleukin-10 (IL-10) or another anti-inflammatory cytokine.

The vectors useful in the methods of this  
10 invention replicate specifically in specific tumor cells. The tumor specificity results from the incorporation of tumor specific gene regulatory regions which drive the expression of one or more genes which are essential for replication. Such elements include, for example, the  
15 alpha-fetoprotein promoter/enhancer, the carcinoembryonic antigen promoter/enhancer, the tyrosine promoter/enhancer and the prostate specific antigen promoter/enhancer. Each of these gene regulatory regions functions preferentially in specific tumor cell types. For  
20 example, the alpha-fetoprotein promoter/enhancer functions preferentially in hepatocellular carcinoma tumor cells. The carcinoembryonic antigen promoter/enhancer functions preferentially in colon cancer and breast tumor cells whereas the prostate  
25 specific antigen promoter/enhancer functions in prostate tumor cells. Finally, the tyrosine promoter enhancer preferentially functions in melanoma tumor cells. Thus, the invention provides for the treatment of cancers including, for example, breast cancer, colorectal cancer,  
30 hepatocellular carcinoma and melanoma cancer.

Administration of the replication competent vectors is accomplished by methods well known to those

skilled in the art. Such administration can be either alone or in acceptable pharmaceutical mediums.

A pharmaceutically acceptable carrier can contain a physiologically acceptable compound that acts, for example, to stabilize the composition or to increase or decrease the absorption of the agent. A physiologically acceptable compound can include, for example, carbohydrates, such as glucose, sucrose or dextrans, antioxidants, such as ascorbic acid or glutathione, chelating agents, low molecular weight proteins or other stabilizers or excipients. Other physiologically acceptable compounds include wetting agents, emulsifying agents, dispersing agents or preservatives, which are particularly useful for preventing the growth or action of microorganisms. Various preservatives are well known and include, for example, phenol and ascorbic acid. One skilled in the art would know that the choice of a pharmaceutically acceptable carrier, including a physiologically acceptable compound, depends, for example, on the route of administration of the polypeptide and on the particular physio-chemical characteristics of the specific polypeptide. For example, a physiologically acceptable compound such as aluminum monostearate or gelatin is particularly useful as a delaying agent, which prolongs the rate of absorption of a pharmaceutical composition administered to a subject. Further examples of carriers, stabilizers or adjuvants can be found in Martin, Remington's Pharm. Sci., 15th Ed. (Mack Publ. Co., Easton, 1975), incorporated herein by reference. The pharmaceutical composition also can be incorporated, if desired, into liposomes, microspheres or other polymer matrices (Gregoriadis, Liposome Technology, Vol. 1 (CRC Press, Boca Raton, Florida 1984), which is incorporated

herein by reference). Liposomes, for example, which consist of phospholipids or other lipids, are nontoxic, physiologically acceptable and metabolizable carriers that are relatively simple to make and administer.

5           The replication competent vectors can be administered as pharmaceutical compositions which include the vectors described herein in combination with one or more of the above pharmaceutically acceptable carriers. The compositions can then be administered therapeutically  
10 or prophylactically. Methods of administering a pharmaceutical containing the vector of this invention, are well known in the art and include but are not limited to, administration orally, intra-tumorally, intravenously, intramuscularly or intraperitoneal.  
15 Administration can be effected continuously or intermittently and will vary with the subject and the condition to be treated, e.g., as is the case with other therapeutic compositions (Landmann et al. (1992); Aulitzky et al. (1991); Lantz et al. (1990); Supersaxo et  
20 al. (1988); Demetri et al. (1989); and LeMaistre et al. (1991)).

It is understood that modifications which do not substantially affect the activity of the various embodiments of this invention are also included within  
25 the definition of the invention provided herein. Accordingly, the following examples are intended to illustrate but not limit the present invention.

#### EXAMPLE I

A recombinant adenovirus vector has been  
30 constructed which is distinct from wild-type Adenovirus type 5 in two ways. First, the Ela promoter contained

between Ad5 coordinates 355 and 483 has been deleted and replaced with a 1.7 kb fragment encoding the alpha-fetoprotein (AFP) enhancer/promoter. Second, the E3 region between Ad5 coordinates 28583 and 30470 has been  
5 deleted and in its place we have inserted the HSV-1 TK gene. The DNA deleted in E3 is non-essential for virus replication. The recombinant virus vector, by virtue of its AFP control elements replicates preferentially in AFP cancer cells. This allows the effect of the therapeutic  
10 gene contained in E3, in this example HSV-1 TK, to be amplified preferentially in those cells in which the tumor specific promoter is activated. The AFP promoter is activated in hepatocellular carcinomas as well as other cancers and this recombinant replication competent  
15 adenovirus vector provides a means of treating these cancers. Together tumor specific promoters can be inserted in place of the AFP enhancer/promoter in order to amplify the virus in other tumor types. This virus can be administered either systemically or by  
20 intratumoral injection. Because it is self replicating only a small amount of virus is required to initiate therapy of the tumor cells.

Methods - All plasmid and viral constructs were constructed using standard methods (Sambrook et al.  
25 1989, Graham and Prevec, 1991).

Recombinant Plasmid Constructions - E1 region. To place the E1a gene under control of a tumor specific promoter plasmids were constructed using standard methods. Plasmid pcDNA3 Ad2 E1 was constructed  
30 by cloning the adenovirus type 2 E1a gene into the commercially available vector pcDNA3 (Invitrogen Corp.). The E1a gene was isolated by polymerase chain reaction

upon pure Ad2 DNA (Gibco/BRL) using the following primers:

5' Ela PCR primer: CTG AAG CTT GAG TTC CTC AAG AGG CCA  
CTC

5 3' Ela PCR primer: GCG CTC GAG ATT TAA CAC GCC ATG CAA  
GTT

The 1189 bp Ela PCR product was run on a 1% agarose gel and the band was excised via razor blade and purified from the agar via GeneClean II (Bio101 Inc.) The  
10 purified PCR product was then digested with XhoI and Hind III and cloned into the Hind III and Xho I site of pcDNA 3 to generate pcDNA3 Ad2 Ela. Plasmids pAd/AFP/B was constructed by cloning the alpha fetoprotein enhancer/promoter between the X and Y sites of the  
15 adenovirus transfer vector pLTR B. This vector was constructed similarly to pAANTK which is described below. To construct pAd/AFP/Ela the Ad2 Ela gene was isolated from pcDNA3 as an HindIII (blunted with Klenow polymerase)/NcoI restriction fragment and inserted  
20 adjacent to the AFP promoter in pAd/AFP/B between the XbaI (blunted with Klenow polymerase) and NcoI sites.

#### Recombinant Plasmid Constructions - E3

region. In order to insert a therapeutic gene such as a cytotoxic gene into the adenoviral E3 region we  
25 constructed the plasmid pSE280-E3 delta as described below. The construct was generated by cloning an Ad5 restriction fragment (MunI/DraI) corresponding to Ad5 nucleotide coordinates 26045 to 38711 between the EcoRI and SmaI sites of pSE280 (Invitrogen Corp.). The  
30 resulting plasmid pSE280 E3 5' was then cut with restriction enzymes NheI and SnaBI and a second restriction fragment of adenoviral DNA (XbaI/EcoRV)



corresponding to Ad5 nucleotides 30471-33756 was inserted. The resulting plasmid pSE280-E3 delta contains the adenoviral E3 region except for a deletion corresponding to adenoviral coordinates 28711-30471.

- 5 These sequences are not essential for adenoviral replication and foreign genes can be inserted into the region. To insert the TK gene into this region a TK gene fragment isolated by PCR of the TK gene and flanked by XbaI and BamHI restriction sites was isolated by
- 10 polymerase chain reaction upon pAANTK and cloned into the XbaI and BamHI sites of pSE280-E3 delta to generate pSE280/E3 delata/TK.

- The plasmid pACNTK which is similar to pAANTK was constructed by subcloning the HSV-TK gene from
- 15 pMLBTK (ATCC No. 39369) into the polylinker of a cloning vector, followed by isolation of the TK gene with the desired ends for cloning into the pACN vector. The pACN vector contains adenoviral sequences necessary for *in vivo* recombination to occur to form recombinant
- 20 adenovirus. The construction of the plasmid pAANTK entailed the PCR amplification of fragments encoding the  $\alpha$ -fetoprotein enhancer (AFP-E) and promoter (AFP-P) regions subcloned through several steps into a final plasmid where the AFP enhancer and promoter are upstream
- 25 of the HSV-TK gene followed by adenovirus Type 2 sequences necessary for *in vivo* recombination to occur to form recombinant adenovirus.

#### Construction of Recombinant Adenoviruses -

- To generate a recombinant adenovirus in which the Ela
- 30 promoter has been replaced by a tumor specific promoter, the plasmid pAd/AFP/Ela was cut with the restriction enzyme ClaI and then ligated to the adenovirus dl309 (Jones and Shenk, 1979) which had also been cut with

Clal. This ligated DNA was used to transfect 293 cells and the resulting virus plaques were screened by restriction analysis for the insertion of the AFP promoter. The resulting virus was called rAd - AFP -

5 Ela/309. The HSV-1 TK gene was then replaced into the E3 region of Ad-AFP-Ela/309 by cutting the DNA of this virus with the restriction enzymes EcoRI and SrfI and then co-transfecting the viral DNA into 293 cells with pSE280-E3 delta/TK DNA cut with BstEII and KpnI. Recombinant viral

10 plaques resulting from *in vivo* recombination were isolated and screened by restriction analysis for the presence of the TK gene inserted into the E3 region.

#### ANALYSIS OF VIRAL REPLICATION

1x 10E+6 of Hep3B (AFP positive HCC cell

15 line) and HLE (AFP negative cell line) cells were seeded in 10cm tissue culture plates. After 24 hours the cells were infected with rAd/AFP-Ela-TK or dl327 at MOI 1. Viral DNA was harvested from the infected cells after 24hr, 48hr, and 5 day post-infection. The viral DNA was

20 prepared for analysis as follows:

1. Remove the cell medium and wash once with the HBSS buffer.
2. Trypsinize the cells with 1x trypsin -EDTA.
3. Pellet the cells in the Beckman TJ-6 table top
- 25 centrifuge at speed 6 for 5 min.
4. Resuspend the cell pellet with ice-cold PBS twice.
5. Add 650 ul of Hirt lysis buffer: 10mM Tris (pH7.5), 10mM EDTA, 0.6% SDS, and 163 ul of 5M
- 30 NaCl to each cell pellet. Incubate at -20°C for 1hr.

6. Spin the samples at room temperature in the microfuge for 30 min. Transfer the supernatant into microcentrifuge tube.
7. Add proteinase K to 200 ug/ml and incubate tubes at 37°C for 1hr.
8. Extract the viral DNA with an equal volume of phenol:chloroform/isoamyl alcohol (49:1) once and then with equal volume of chloroform once.
9. Precipitate the viral DNA with 2 volume of 100% ethanol and wash the pellet with 70% of ethanol.
10. Resuspend the pellet in 29 microliters of TE pH 8.0.

10 microliters of each viral DNA sample was digested with restriction endonuclease Xho 1 at 37°C overnight. The digested DNA samples were run on a 0.8% agarose gel at 20v overnight. The digested DNA was transferred from the gel to a nylon membrane using a Stratagene Posiblot pressure blotter. To detect adenoviral replication the membrane was probed with a 32-P probe which contains sequence corresponding to 1711-2266 of Ad2. The blot was exposed to a phosphoimager screen for 1 hour and the autoradiographic image was acquired and quantitated using a Molecular Dynamics phosphorimager. Replication data for each cell line was compared to replication of the wild-type virus dl327 in that cell line.

## RESULTS

To assess the replication potential of rAd/AFP-Ela-TK the virus was used to infect cell lines which either utilize the AFP promoter (Hep-3B) or do not utilize this promoter (HLE). After the initial infection at a multiplicity of infection of 1, viral DNA was

harvested at 1, 2 or 5 days and analyzed by Southern blot analysis and quantitated using a Molecular Dynamics phosphorimager. As a control and standard the cells were also infected with the replication competent adenovirus dl327. 5 dl327 is a wild-type adenovirus from which the same non-essential segment of E3 has been deleted which is deleted in rAd/AFP-Ela-TK and therefore serves as an appropriate control of viral replication. By comparing the replication of rAd/AFP-Ela-TK to that of dl327 in 10 each of the two cell lines it is possible to assess the effect of replacing the viral Ela promoter with the AFP promoter/enhancer. These experiments indicated that this replacement placed the rAd/AFP-Ela-TK at a replicative disadvantage compared to dl327 in the AFP negative HLE 15 cell line. In contrast rAd/AFP-Ela-TK replicated much more efficiently in the AFP positive tumor cell line. Although the regulation is not absolute, there is a 4 to 5 fold replication advantage in the AFP positive versus negative cell line.

20           Although the invention has been described with reference to the disclosed embodiments, those skilled in the art will readily appreciate that the specific experiments detailed are only illustrative of the invention. It should be understood that various 25 modifications can be made without departing from the spirit of the invention. Accordingly, the invention is limited only by the following claims.

## We Claim:

1. A method of treating mammalian cancer cells, comprising administering a replication competent adenoviral vector comprising a therapeutic gene and a disease specific gene regulatory region operationally linked to at least one replication gene wherein the cancer cells activate the tumor specific gene regulatory region causing the adenoviral vector to replicate.
2. The method of claim 1, wherein the disease specific gene regulatory region is the alpha-fetoprotein promoter/enhancer.
3. The method of claim 2, wherein the cancer cells are hepatocellular carcinoma.
4. The method of claim 1, wherein the disease specific gene regulatory region is the carcinoembryonic antigen promoter/enhancer.
5. The method of claim 4, wherein the mammalian cancer cells are breast cancer cells.
6. The method of claim 4, wherein the mammalian cancer cells are colorectal cancer cells.
7. The method of claim 1, wherein the disease specific gene regulatory region is the prostate specific antigen promoter/enhancer.

8. The method of claim 7, wherein the mammalian cancer cells are prostate cancer cells.
9. The method of claim 1, wherein the disease specific gene regulatory region is the tyrosinase promoter/enhancer.
10. The method of claim 9, wherein the mammalian cancer cells are melanoma cancer cells.
11. The method of claim 1, wherein the foreign gene is a suicide gene.
12. The method of claim 11, wherein the suicide gene is the herpes-simplex thymidine kinase gene.
13. The method of claim 1, wherein the therapeutic gene is a tumor suppressor gene.
14. The method of claim 13, wherein said tumor suppressor gene is selected from the group consisting of p53, RB, RB mutants, p21, p53 mutants.
15. The method of claim 1, wherein the replication gene is the Ela gene.
16. The method of claim 15, wherein the replication gene is one of the viral E1 genes.
17. The method of claim 1, wherein the replication gene is the viral E2 gene.

18. The method of claim 1, wherein the replication gene is the E4 gene.

1/2

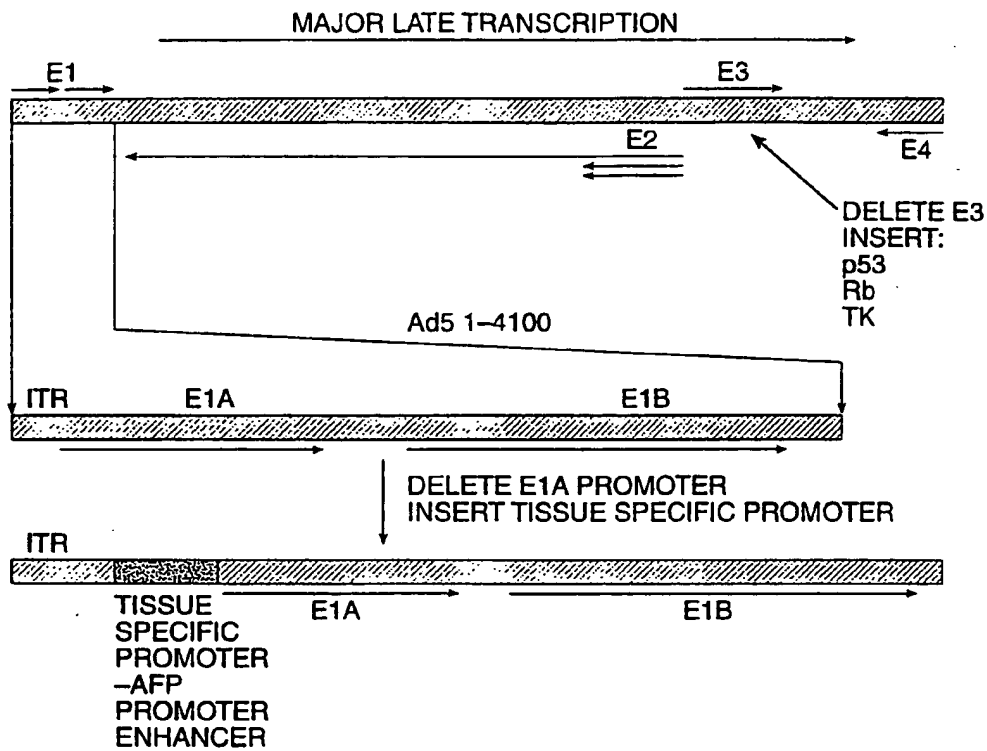


FIG. 1

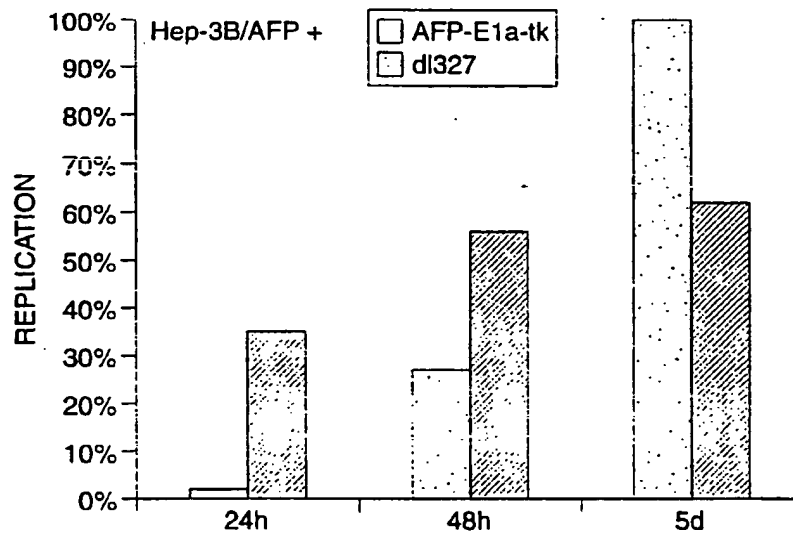


FIG. 2A



2/2

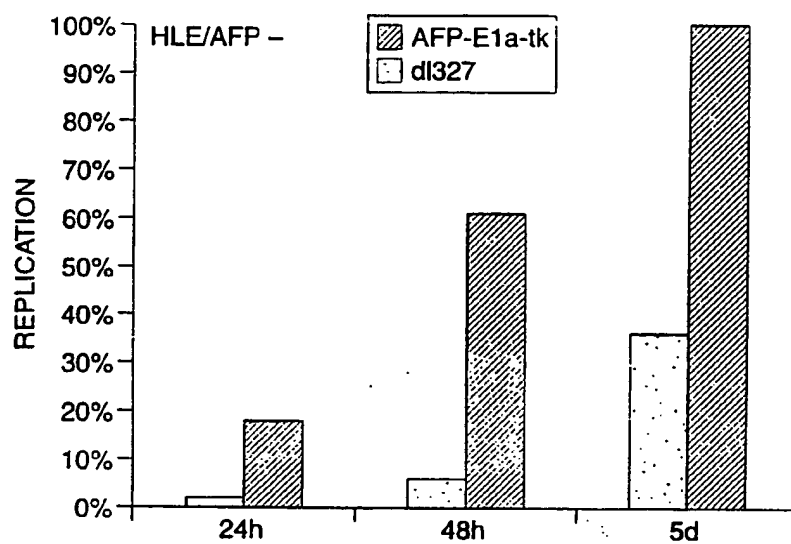


FIG. 2B

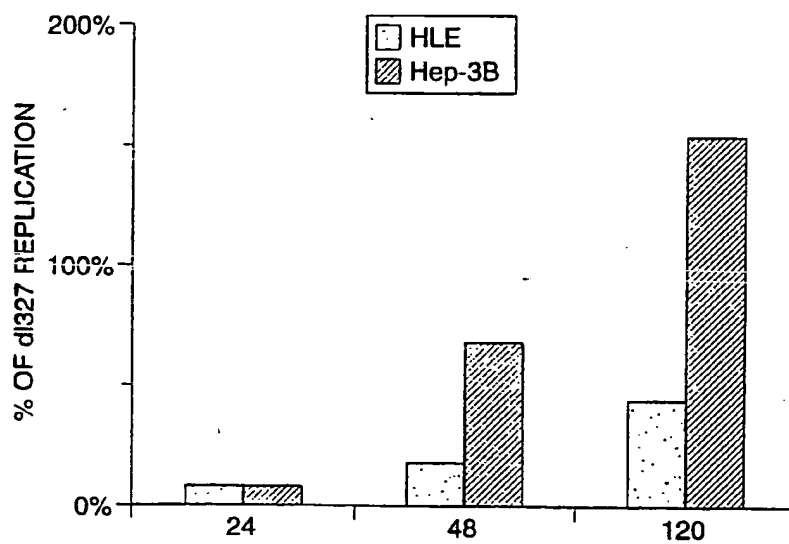


FIG. 3

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PC1/US 96/06199

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C12N15/86 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	WO,A,96 17053 (GENETIC THERAPY INC ;HALLENBECK PAUL L (US); CHANG YUNG NIEN (US);) 6 June 1996 see the whole document ---	1-18
A	WO,A,94 18992 (ONYX PHARMACEUTICALS) 1 September 1994 see the whole document ---	1-18
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 September 1996

Date of mailing of the international search report

18. 10. 96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hornig, H

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PL 1/US 96/06199

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	J. VIROLOGY, vol. 57, no. 1, January 1986, AM.SOC.MICROBIOL.,WASHINGTON,US; pages 267-274, XP002014457 Y.-HAJ-AHMAD AND F.L. GRAHAM: "Development of a helper-independent human adenovirus vector and its use in the transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene" see the whole document ---	1-18
A	PROC. NATL.ACAD SCI., vol. 84, July 1987, NATL. ACAD SCI.,WASHINGTON,DC,US; pages 4626-4630, XP002014458 J.E. MORIN ET AL.: "Recombinant adenovirus induces antibody response to hepatitis B virus surface antigen in hamster" see the whole document ---	1-18
A	J. INFECTIOUS DISEASES, vol. 161, 1990, UNIVERSITY CHICAGO, US, pages 27-30, XP002014459 L. PREVEC ET AL.: "A recombinant human adenovirus vaccine against rabies" see the whole document ---	1-18
A	J. GENERAL VIROLOGY, vol. 76, no. 1, January 1995, READING, BERKS, GB, pages 93-102, XP002014460 S.K. MITTAL ET AL.: "Development of a bobine adenovirus type 3-based expression vector" see the whole document ---	1-18
P,A	WO,A.95 11984 (CANJI INC) 4 May 1995 see the whole document -----	1-18

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 96/06199

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 1-18  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Remark: Although these claims are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 96/06199

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9617053	06-06-96	AU-A- 4504396	19-06-96
WO-A-9418992	01-09-94	AU-A- 6272294	14-09-94
		CA-A- 2152941	01-09-94
		EP-A- 0689447	03-01-96
		JP-T- 8507076	30-07-96
WO-A-9511984	04-05-95	AU-A- 8125094	22-05-95
		CA-A- 2173975	04-05-95
		NO-A- 961639	24-06-96
		AU-A- 2637295	18-12-95
		WO-A- 9532020	30-11-95
		US-A- 5534015	09-07-96